

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

Untersuchungen über die Bildung von Antikörpern
gegen *Coxiella burneti*-Antigen (Phase II)
bei Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Bernd Viehmann
Tierarzt aus Hannover

Gießen 1973

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

Untersuchungen über die Bildung von Antikörpern gegen Coxiella burneti-Antigen (Phase II) bei Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Bernd Viehmann
Tierarzt aus Hannover

Gießen 1973



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin in Gießen

Dekan: Prof. Dr. E. Weiss

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Schliesser

Tag der mündlichen Prüfung: 13.9.1973



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Geschichtliches und Nomenklatur	2
2.2. Morphologie von <i>Coxiella burneti</i>	3
2.3. Tenazität von <i>Coxiella burneti</i>	4
2.4. Züchtung des Erregers und Phasenwechsel	5
2.5. Vorkommen und Epidemiologie	7
2.5.1. Bei Tieren	7
2.5.2. Beim Menschen	9
2.6. Schutzimpfungen gegen Q-Fieber	10
2.6.1. Beim Menschen	10
2.6.2. Bei Haustieren	12
2.7. Q-Fieber-Impfung bei Versuchstieren	12
2.8. Diagnose des Q-Fiebers	16
2.8.1. Mikroskopischer Nachweis	17
2.8.2. Anreicherung des Erregers im Brutei	17
2.8.3. Anreicherung des Erregers im Versuchstier	17
2.8.4. Komplementbindungsreaktion	19
2.8.5. Agglutinationsreaktionen	21
2.8.6. Weitere Nachweismethoden	22
3. Eigene Untersuchungen	24
3.1. Material und Methode	24
3.1.1. Versuchstiere	24
3.1.2. Antigene	24
3.1.3. Adjuvans	25
3.1.4. Immunisierungsverfahren (Tab. S. 27, 28)	26
3.1.5. Blutentnahme	26
3.1.6. Antikörperbestimmung in der Komplement- bindungsreaktion	26

3.1.7. Behandlung der Seren mit 2-Mercaptoäthanol (2-MÄ)	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Versuchsreihe I (Tab. S. 49, Abb. S. 52, 53)	37
4.2. Versuchsreihe II (Tab. S. 50, Abb. S. 54, 55)	44
4.3. IgG- und IgM-Anteil der Seren im Verlauf der Immunantwort	48
5. Besprechung der Ergebnisse (Abb. S. 69-74)	56
5.1. Unterschiedliche Anzahl der Injektionen	56
5.2. Unterschiedliche Dosierung des Antigens	58
5.3. Unterschiedliche Applikationsform des Antigens	60
5.4. Verwendung von komplettem Freund'schen Adjuvans	62
5.5. Boosterinjektion	64
5.6. IgG- und IgM-Anteil im Verlauf der Immunantwort	67
6. Zusammenfassung	75
7. Literaturverzeichnis	77

1. Einleitung

Das Q-Fieber ist eine in Deutschland und vielen anderen Ländern sporadisch vorkommende Erkrankung bei Haustieren (vor allem Rind und Schaf), deren Erreger über Ausscheidungen dieser Tiere auch auf den Menschen übertragen werden.

Das Q-Fieber, das beim Menschen atypische Pneumonien hervorruft, hat somit den Charakter einer echten Zoonose. Infolge der hohen Empfänglichkeit des Menschen sind neben Einzelerkrankungen in der Vergangenheit wiederholt Massenerkrankungen aufgetreten.

Rechtzeitige und wirkungsvolle Bekämpfungsmaßnahmen sind von einer raschen und sicheren Diagnose abhängig. Eine Möglichkeit der Entwicklung schneller und leistungsfähiger diagnostischer Methoden zum Rickettsienachweis bietet die Fluoreszenzserologie. Eine Voraussetzung dafür ist die Herstellung spezifischer Antiseren gegen *Coxiella burneti*.

Es war meine Aufgabe zu untersuchen, mit welchen Immunisierungsmethoden sich bei Kaninchen möglichst hochtitrige Antiseren gewinnen lassen.

Dabei sollte insbesondere der Einfluß von Art, Applikationsform und Dosis des Antigens, sowie von Freund'schem Adjuvans und Booster-Impfungen auf die Immunantwort berücksichtigt werden.

Die Antikörperbestimmungen erfolgten durch regelmäßige Serumuntersuchungen in der Komplementbindungs-Reaktion über einen längeren Zeitraum hinweg, wobei teilweise auch IgG und IgM getrennt ermittelt wurden.

2. Literatur

2.1. Geschichtliches und Nomenklatur

Das Q-Fieber ist der Prototyp einer Zooanthroponose, d. h. einer Erkrankung die vom Tier kommt und auf den Menschen übertragen werden kann (HARTWIGK 1958). Der Begriff Q-Fieber leitet sich nicht von der Landschaft Queensland in Australien, wo die Erkrankung zum erstenmal beobachtet wurde, ab, sondern bedeutet die Abkürzung des Wortes "query" = Fragezeichen. Dieser Begriff wurde von DERRICK geprägt, als die Ätiologie der Erkrankung noch nicht bekannt war.

Die ersten Krankheitsfälle waren 1935 bei Arbeitern des Schlachthauses von Sidney beobachtet und von DERRICK (1937) als "new fever entity" beschrieben worden.

BURNET und FREEMAN (1937) wiesen durch Übertragungsversuche mit dem Blut der Erkrankten auf Mäuse und Meerschweinchen die Rickettsien-Ätiologie dieser Krankheit nach. Der Erreger wurde 1939 von DERRICK *Rickettsia burneti* benannt.

1938 hatten auch DAVIS und COX (1938) ein filtrierbares Agens aus Zecken der Spezies *Dermacentor andersoni* isoliert, die in der Nähe von Nine Mile Creek, USA, gesammelt worden waren.

COX (1940) zeigte, daß es möglich war, mit diesem Agens Meerschweinchen intranasal, intraperitoneal, subkutan, intramuskulär sowie intracerebral zu infizieren, wobei die Tiere fieberige Reaktionen zeigten. Pathologisch-anatomisch waren vergrößerte Mesenterial- und Inguinal-lymphknoten festzustellen, außerdem vergrößerte Milzen. Die infizierten Tiere zeigten 116 Tage nach der Infektion noch eine belastungsfähige Immunität.

Durch Milzpassagen konnte das Agens erhalten werden. Es passierte Berkefeld N- und -W-Filter, die für die bis dahin bekannten Rickettsien undurchlässig waren. In Milz-

abklatschpräparaten infizierter Meerschweinchen wurden intra- und extrazellulär liegende Organismen mit rickettsienähnlicher Morphologie gefunden.

Auf Grund seiner Filtrierbarkeit durch Filter, die für Bakterien und andere Rickettsien undurchlässig waren, nannte COX (1940) diesen Organismus zunächst Rickettsia diaporica.

1943 schlug PHILLIP (1943) vor, für den Erreger des Q-Fiebers ein neues Genus zu schaffen und nannte ihn nach dem amerikanischen Forscher H. R. Cox Coxiella burneti.

Nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) ist der Erreger des Q-Fiebers im biologischen System wie folgt eingeordnet:

Klasse	III	: Microtatoobiales
Ordnung	I	: Rickettsiales
Familie	I	: Rickettsiaceae
Tribus	I	: Rickettsieae
Genus	I	: Rickettsia
Genus	II	: Coxiella
Art		Coxiella burneti

2.2. Morphologie des Q-Fiebererregers

Coxiella burneti zeigt sich nach Giemsa gefärbt als länglich ovales Gebilde von $0,25 \times 0,5 \mu$ Größe oder auch als bipolar gefärbtes Stäbchen von $0,25 \times 1,5 \mu$, wobei auch Kettenbildung beobachtet wurde (MOOSER 1969).

Elektronenmikroskopisch stellt sich Coxiella burneti als ein elliptisches bis stäbchenförmiges Gebilde dar, das häufig in Doppelform auftritt (ROSENBERG 1960).

In infizierten Hodenzellen von Meerschweinchen konnten LINSS, STELZNER und URBACH (1969) bei 29600-facher Vergrößerung unregelmäßig elliptische Coxiellen sehen, die

gemeinsam mit einer dichten Matrix von einer Membran umgeben sind. Coxiellen, die in den Vakuolen der Zellen liegen, zeigen einen regelmäßigen Aufbau: Eine Doppelmembran bildet die äußere Begrenzung. Nach innen folgt eine unterschiedlich breite granuläre Zone, in der größere, stark elektrodichte Granula sowie strangartige Gebilde auftreten.

2.3. Tenazität von Coxiella burneti

Coxiella burneti ist unter den nicht sporenbildenden Mikroorganismen einer der widerstandsfähigsten. In getrocknetem Meerschweinchenblut behält der Erreger seine Infektiosität 182 Tage, in getrocknetem Urin 49 Tage (PARKER 1949). Nach KULAGIN (zit. nach SCHMIDT) überlebten Q-Fieber-Rickettsien in reinem Leitungswasser etwa 160 Tage.

Bei Kühlhaustemperatur blieb der Erreger in Butter, die aus unerhitzter Sahne hergestellt wurde, 41 Tage lang vermehrungsfähig (COMBIESCO 1957, zit. nach MAY).

PINTO (1959) berichtet, daß Coxiella burneti bei Lagerung von -20°C zwei Jahre lang lebensfähig bleibt.

Lyophilisierte Coxiellen überlebten bei Lagerung von $+4^{\circ}\text{C}$ im Vakuum acht bis zehn Jahre (PAUTOV und POLOZOV, zit. nach LUDWIG).

Im Gegensatz zu anderen Rickettsien, die bei 56°C in 30 Minuten abgetötet werden oder auch Eintrocknen bei Zimmertemperatur und im Brutschrank nicht überleben, ist Coxiella burneti gegen höhere Temperaturen und gegen Antiseptika sehr widerstandsfähig. Nach PHILIP (1948) überlebte Rickettsia burneti in getrocknetem Zeckenkot bei Raumtemperatur 586 Tage. HÜBNER und RAMSON (1951) stellten fest, daß der Erreger bei einer Temperatur von 63°C und einer Einwirkungszeit von 30 - 40 Minuten noch nicht abgetötet war. Auch im dritten Bericht der FAO/WHO (1967) ist angegeben, daß Coxiella burneti bei 30 Minuten Erhitzung

auf $61,7^{\circ}\text{C}$ nicht abgetötet wurde, bei 66°C war der Erreger jedoch nach 30 Minuten inaktiviert.

HARTWIGK (1958) vertritt die Auffassung, daß die bei der Dauerpasteurisierung der Milch angewandten Hitzegrade ($63^{\circ} - 65^{\circ}\text{C}$ 30 Minuten lang) ausreichen, den Erreger abzutöten. Eine sichere Abtötung wird nach SCHAAF (1962) bei Temperaturen von 100°C erreicht.

Nach Bergey's Manual (1957) wird eine Abtötung des Erregers nach 24stündiger Einwirkung einer 0,5%igen Formalin-Lsg. sowie 1%iger Phenol-Lsg. nicht erreicht. Nach RAMSON und HÜBNER (1951) tolerieren die Organismen auch 1%iges Formalin über 24 Stunden. Ultraschallbehandlung zeigt nach KIRBERGER (1951) keine Wirkung. Bei der Ätherextraktion einer Dottersacksuspension wird *Coxiella burneti* in ca. 20 Min. inaktiviert (MOOSER 1969).

2.4. Züchtung des Erregers und Phasenwechsel

Coxiella burneti läßt sich im bebrüteten Hühnerei und in Gewebekulturen züchten. Auf künstlichen, zellfreien Nährmedien gelingt die Anzüchtung nicht.

URBACH und Mit. (1960) zeigten jedoch, daß der Erreger auch in einem synthetischen Nährsubstrat mit Natriumglutamat während der Versuchsdauer von 8 Stunden Stoffwechselleistungen, gemessen an einer O_2 -Zehrung, erkennen ließ. Für diese begrenzten Stoffwechselleistungen sprechen auch die Untersuchungsergebnisse mit radioaktivem Phosphor, der als inkorporierter ^{32}P in der säurelöslichen Fraktion lebender Rickettsien nachgewiesen werden konnte.

Serologisch tritt *Coxiella burneti* in 2 Phasen auf. STOKER (1956) zeigte, daß frisch isolierte Stämme, die nur wenige Passagen im Dottersack des Hühnerembryos durch-

laufen hatten, mit Rekonvaleszentenserum nicht reagierten, aber nach längeren Dottersackpassagen reaktiv wurden. Auch ein Stamm (in diesem Fall der Stamm "Nine Mile") aus einer hohen (2o) Dottersackpassage verlor durch Meerschweinchenpassagen seine Reaktivität mit Rekonvaleszentenserum, um nach erneuten Eipassagen wieder reaktiv zu werden. Dieses Phänomen wird Phasenvariation oder Phasenwechsel genannt:

		Dottersack- passage		
<u>Phase I</u>	nicht reagierend		reagierend	<u>Phase II</u>
		Versuchstier- passage		

Die in der Natur gefundenen Coxiellen liegen stets in Phase I vor (FISSET 1956).

Bei *Coxiella burnetii* (Phase I) tritt eine Anlagerung von Ferritingranula an der Oberfläche der Rickettsienzelle nur ein, wenn diese mit Ferritin-markierten Antikörpern, die Phase I entsprechen, behandelt wurde, nicht aber bei Behandlung mit markierten Antikörpern gegen Zellen der Phase II. Wird *Coxiella burnetii* (Phase II) mit markierten Antikörpern der Phase II behandelt, tritt ebenfalls eine Anlagerung von elektronenoptisch dichten Ferritingranula an die Zellen auf.

Diese Resultate zeigen, daß das Antigen der Phase I gegenüber dem der Phase II mehr nach außen gelegen ist (CRACEA 1968).

Auch nach FISSET (1956) besitzt *Coxiella burnetii* in der Phase I ein Oberflächenantigen, das ein tiefer liegendes Antigen verdeckt und bei Übergang in die Phase II verschwindet. Der Phasenwechsel wird dementsprechend von BREZINA (1963) mit dem Verschwinden eines wahrscheinlich Polysaccharidcharakter besitzenden Oberflächenantigens erklärt.

2.5. Vorkommen und Epidemiologie

2.5.1. Bei Tieren

In der Natur hat *Coxiella burneti* eine große Verbreitung, die nicht streng auf wenige Vektorarten begrenzt ist. Seit in Australien die natürliche Infektion des Bandicoot, eines kleinen Beuteltieres, und dessen Zecken nachgewiesen worden waren (DAVIS, COX 1938), fand man den Erreger in vielen Zeckenarten in USA, Europa, Afrika und Australien. Die Breite des Vorkommens schließt Arthropoden, Vögel und Säugetiere ein, wo der Erreger bei vielen Insektenfressern, Singvögeln, Fledermäusen, Nagetieren und niederen Säugern bis hinauf zu den Primaten nachgewiesen worden ist.

Die Arthropoden sind entweder in den Entwicklungskreislauf des Erregers eingeschaltet oder bei der Verbreitung und Übertragung der Krankheit unter Wildtieren und von Wild- auf Haustiere beteiligt (WEYER 1949).

In Zecken vermehren sich die Erreger hauptsächlich in den Mitteldarm- bzw. Magenzellen und werden mit dem Kot ausgeschieden. Auf diese Weise gelangen die Erreger in das Fell bzw. Haar oder Gefieder der Tiere und auf den Erdboden, von wo aus andere Tiere und der Mensch angesteckt werden (GMITTER 1960).

Andere Insekten wie Hausfliegen, Kleiderläuse, Flöhe und Mehlkäferlarven lassen sich künstlich infizieren. In welchem Umfang diese Insekten im natürlichen Milieu als Überträger eine Bedeutung haben, ist nicht bekannt.

Die Bedeutung der Zecken liegt nicht darin, daß sie die Krankheit auf den Menschen übertragen, sondern in ihrer Eigenschaft als Reservoir und Ansteckungsquelle für Wild- und Haustiere.

Natürlich infizierte Zecken gehören nach einer Zusammenstellung von REUSSE (1960) zu 6 Spezies der Familie der "Argasiden" und 31 Spezies der Familie der "Ixodiden". Experimentell lassen sich weitere 10 Spezies dieser Familien infizieren.

Durch den Befall der Ovarien einiger Zeckenarten ist auch eine germinative Übertragung des Erregers auf die F_1 Generation erwiesen.

Von DERRICK und SMITH (1940) wurde der Bandicoot, ein Beuteldachs (*Isodon torosus*), als Erregerreservoir entdeckt.

Nach experimenteller Infektion des Bandicoot trat bei diesem Tier eine inapparente Infektion auf. Da der Erreger längere Zeit im Blut des infizierten Tieres vorhanden war, hatten angesetzte Zecken Gelegenheit, die Coxiellen aufzunehmen, was durch Nachweis der Coxiellen in den Zecken bewiesen wurde. Der Kontaktinfektion kommt eine untergeordnete Rolle zu, da die Erregerausscheidung beim Bandicoot gering ist und die Nachgeburten noch während der Geburt vom Muttertier aufgefressen werden.

Neben diesem Zyklus Bandicoot-Zecke-Bandicoot beschreibt DERRICK (1953) noch einen Känguruh-Zecken-Zyklus.

Weiterhin sind Zyklen zwischen Wüstenspringmaus und Zecke in Marokko und zwischen Bergkaninchen und Zecke in Spanien bekannt.

Die Zecke dient also einmal als Überträger innerhalb der Wildnagerpopulation, zum anderen auch als Überträger vom Nagetier auf das Haustier. Dies ist dadurch bedingt, daß die meisten Zecken zwei- bis dreiwirtig sind, das heißt, sie parasitieren in den einzelnen Entwicklungsstadien auf verschiedenen Wirtstieren. Die Larven und Nymphen befallen hauptsächlich kleine Säugetiere, besonders Nager, und erst während ihrer Geschlechtsreife im Imago-Stadium werden große Säugetiere wie auch die Haustiere zum Blutsaugen aufgesucht (REUSSE 1960).

Das Q-Fieber hat bei Tieren weltweite Verbreitung. Die Infektion verläuft bei Rind, Schaf und Ziege meistens symptomlos, es können jedoch Aborte auftreten. Dabei werden die Erreger nach der Geburt mit dem Fruchtwasser in großen Mengen ausgeschieden. Das infektiöse Material,

das mit Fruchtwasser, Sekreten und Exkreten auf den Boden gelangt, trocknet ein und der Staub dient *Coxiella burneti* als Vehikel bei der Verbreitung. DERRICK (1953) hat errechnet, daß eine bovine Plazenta von 4 kg Gewicht, getrocknet und pulverisiert, auf eine Fläche von 400000 m^2 gestreut, auf einem mm^2 theoretisch die Dosis Rickettsien enthält, die genügt, ein Meerschweinchen zu infizieren.

2.5.2. Beim Menschen

Die ersten Berichte über Q-Fieber Infektionen kamen aus Australien, später wurden auch Ansteckungen des Menschen in den verschiedensten Ländern der Erde beobachtet. Nach einer Zusammenstellung der WHO aus dem Jahre 1955 war bis dahin die Krankheit in 51 Ländern aller Erdteile diagnostiziert worden. Nur aus Skandinavien, Holland und Irland lagen keine Mitteilungen vor.

In den USA tritt das Q-Fieber hauptsächlich in Kalifornien, dort wiederum gehäuft im Süden auf. Aus den anderen Bundesstaaten wurden nur lokal begrenzte Infektionen gemeldet, so aus den Staaten New York, Pennsylvania, Illinois, Texas und Montana (BERTTINA 1955).

In Europa wurden während des zweiten Weltkrieges erstmalig 1941 bei deutschen Truppen auf dem Balkan meist streng ortsgebundene Erkrankungen beobachtet, die klinisch den atypischen Viruspneumonien ähnelten (DENNIG 1942). Auf Grund ihrer damals ungeklärten Ätiologie wurden die Erkrankungen als Balkangrippe, Südostpneumonie, Olympkrankheit und Kretapneumonie, bei deutschen Kriegsgefangenen in Ägypten auch als Siebentage- oder Wüstenfieber bezeichnet.

Nach dem zweiten Weltkrieg wurde Q-Fieber im gesamten Mittelmeerraum, in Frankreich, Österreich, Deutschland, England und der Schweiz, außerdem in vielen Ostblockländern beobachtet.

In Deutschland wurde beim Menschen epi- und endemisch auftretendes Q-Fieber erstmalig 1947/48 diagnostiziert. Die Erkrankungen traten vorwiegend im süddeutschen Raum in ländlichen Gemeinden mit Rinder-, Schaf- und Ziegenhaltung auf. Von 1948 bis 1950 wurden 3000 Erkrankungen mit 20 Todesfällen gemeldet (TRUEB, BOESE und POSCH 1960).

Seit dem Inkrafttreten des Bundesseuchengesetzes vom 1.1.1962 wurden bis zum 31.12.1969 insgesamt 776 Erkrankungsfälle beim Menschen in der Bundesrepublik gemeldet. Sterbefälle traten nicht auf. 95 % der Erkrankungen entfielen auf die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz (WEISE 1971). Der hohe Anteil Bayerns geht im wesentlichen auf den Q-Fieber-Ausbruch von 1964 an der Münchner Tierärztlichen Fakultät zurück, bei dem mindestens 249 Personen erkrankten (SCHLIESSER 1968).

2.6. Schutzimpfungen gegen Q-Fieber

2.6.1. Beim Menschen

Die Q-Fieber-Erkrankung führt zu einer Immunität, die oft, jedoch nicht in allen Fällen lebenslang bestehen bleibt. GSELL (1962) hat darauf hingewiesen, daß Zweiterkrankungen auftreten können, für die das neuerliche Auftreten einer Pneumonie, ein hoher Titeranstieg in der KBR und vor allem die epidemiologische Situation und Exposition hinweisend waren. Die wahrscheinlich über mehrere Jahre belastungsfähige Immunität, die gegenüber anderen Rickettsiosen fehlt (keine Kreuzimmunität), ist gegen alle Stämme der *Coxiella burnetii* gerichtet. Untersuchungen von ROBBINS und Mit. (1946), BURNET, FREEMAN und DERRICK (1939) in Australien, Amerika und Europa ergaben eine immunologische Übereinstimmung der dort isolierten Stämme.

Eine genaue experimentelle Prüfung der Immunitätsentwicklung und Immunitätsdauer beim Menschen nach Vakzination oder Infektion ist nicht möglich. Zwischen dem humoralen Antikörperspiegel, der sich durch serologische Untersuchungen (KBR und Agglutinationsreaktionen) erfassen läßt, und der zellulären Immunität bestehen außerdem keine direkten Beziehungen (SIEGERT 1952). Die durchgeführten Impfstoffprüfungen am Menschen beziehen sich hauptsächlich auf die Untersuchung ihrer Unschädlichkeit - es können gelegentlich hämorrhagische Nephritiden auftreten - und ihrer Fähigkeit, humorale Antikörper zu bilden (de RITIS 1950, COX 1951). Impfstoffprüfungen, die sich nur auf die Beobachtung humoraler Antikörper beziehen, haben keinerlei Beweiskraft für die Bewertung des Impferfolges (SIEGERT 1952).

Die Immunprophylaxe des Menschen mit Q-Fieber-Impfstoffen hat seit dem zweiten Weltkrieg an Bedeutung gewonnen, besonders für einige exponierte Gruppen. Die verwendeten Vakzinen waren meist gereinigte und abgetötete Rickettsien der Phase II, wobei in den USA hauptsächlich mit dem Stamm "Henzerling" gearbeitet wurde (SMADEL 1948, BENENSON 1959).

MEIKLEJOHN und LENETTE (1950) immunisierten 50 Versuchspersonen mit Totimpfstoff von *Coxiella burnetii*, der aus Dottersackkulturen gewonnen worden war.

Bei geimpften Personen, die nach künstlicher Infektion im Gegensatz zu den ungeimpften nicht erkrankten, liessen sich komplementbindende Antikörper nachweisen. Der Titer sank jedoch schon innerhalb weniger Monate deutlich ab. Nachimpfungen im Abstand von 3 Monaten gewährleisteten dagegen einen gleichmäßigen Antikörpergehalt.

TIGERTT und Mit. (1956) berichteten über Versuche mit Freiwilligen, die 9 Monate nach erfolgter Impfung gegen Q-Fieber nach experimenteller aerogener Infektion nicht erkrankten. Auch BLANC und Mit. (1948) entwickel-

ten Impfstoffe, mit denen sie bei gefährdeten Personen gute Erfolge erzielten.

Obwohl bei den Versuchen, die BENENSON (1956) durchführte, nur 50 % der Vakzinen feststellbare Antikörper induzierten, waren die Versuchspersonen gegenüber einer Aerosolverabreichung mit virulenten Coxiellen der Phase I resistent.

2.6.2. Bei Haustieren

Für die Bekämpfung des Q-Fiebers wäre die Schutzimpfung der Haustiere von größerer Bedeutung als die Impfung des Menschen. Da die Ansteckung des Menschen in den meisten Fällen direkt oder indirekt durch das infizierte Tier geschieht, würde in endemisch verseuchten Gebieten nur eine wirksame Schutzimpfung der Haustiere eine gute Bekämpfungsmaßnahme darstellen.

LUOTO u. Mit. (1952) führten mit einer abgetöteten Dottersackvaccine einen Großversuch durch. 147 vakzinierter Kühe und 139 nichtvakzinierter Kontrolltiere wurden in infizierte Herden eingestellt. Nach einem halben Jahr zeigten 14,9 % der vakzinierter Kühe und 46 % der Kontrolltiere spezifische Antikörper. 4,8 % der positiv reagierenden vakzinierter Tiere und 23,7 % der positiven Kontrollen schieden Coxiellen mit der Milch aus.

2.7. Q-Fieber-Impfung bei Versuchstieren

CRACEA u. Mit. (1968) untersuchten die Immunantwort bei Meerschweinchen nach Impfung mit Vakzinen, die einmal mit *Coxiella burnetii* der Phase I (4. Dottersackpassage), zum anderen mit *Coxiella burnetii* der Phase II (80. Dottersackpassage) hergestellt wurden. Durch fraktionierte Zentrifugation und wiederholte Äther-Extraktion wurden

die Antigene gewonnen. Die Vakzination erfolgte dreimal im Abstand von 7 Tagen.

Nach Impfung mit Phase I Antigen (1 ml Antigentiter 1:128; Nitrogengehalt 0,7 mg/ml) zeigten Meerschweinchen nach 6 - 7 Tagen Antikörper der Phase II, die 14 Tage nach der ersten und 7 Tage nach der zweiten Immunisierung einen KBR-Titer von 1:64 erreichten. 6 Tage nach der dritten Immunisierung stieg der Titer auf 1:128 und blieb auf dieser Höhe etwa 2 Monate, um innerhalb der nächsten 4 Monate wieder auf 1:32 abzusinken. KBR-Antikörper gegen Phase I waren erst 6 Tage nach der dritten Immunisierung nachzuweisen. Innerhalb von 2 Monaten stieg der Titer auf einen durchschnittlichen Wert von 1:24 und blieb 4 Monate lang auf dieser Höhe.

Impfung mit Phase II Vakzine (Antigentiter 1:128, Nitrogengehalt 0,53 mg/ml) bewirkte 6 Tage nach der zweiten Immunisierung KBR-Titer gegen Phase II Antigen von 1:16, die 6 Tage nach Gabe der dritten Antigendosis im Mittel der Versuchsgruppe auf 1:96 anstiegen und dann innerhalb von 2 Monaten auf 1:64 absanken. Nach weiteren 4 Monaten betrug der durchschnittliche Titer 1:8. Komplementbindende Antikörper gegen Phase I Antigen konnten nicht festgestellt werden.

Weitere Untersuchungen an Meerschweinchen wurden von Fiset (1957) mit Impfstoffen aus den Stämmen "Nine Mile" (USA) und "Christie" (GB) durchgeführt. Das Antigen bestand aus einer gereinigten Rickettsiensuspension, die aus infiziertem Dottersackmaterial durch wiederholte Äther-Extraktion und Zentrifugation gewonnen worden war. Die Vakzinierung wurde teils mit lebenden Erregern, teils mit einer formalininaktivierten Vakzine durchgeführt (2×10^{13} Organismen/ml).

Nach intraperitonealer Injektion von 1 ml einer 10^{-3} Suspension des lebend Impfstoffes (Coxiellen in Phase II) waren Immunglobuline gegen Phase II-Antigen am 14. Tag nach der Impfung festzustellen, sie erreichten am

20. Tag ihr Titermaximum (KBR-Titer 1:640) und sanken nach einer Konstanz von 10 Tagen kontinuierlich ab, bis sie nach 100 Tagen noch 1:40 betrug.

Nach intraperitonealer Injektion von 1 ml Formolvakzine (Stamm "Nine Mile", Phase II) traten KBR-Antikörper gegen Phase II-Antigen am 8. Tag nach der Immunisierung auf (Titer 1:80). Das Titermaximum von 1:640 wurde am 23. Tag erreicht, danach war ein kontinuierlicher Titerabfall festzustellen, so daß am 100. Tag nach der Impfung der KBR-Titer noch 1:10 betrug.

KUDELINA (1967) impfte Meerschweinchen mit lebenden Coxiellen (10^9 Keime/ml) der Phase II (60. Dottersackpassage). Zuerst wurden 0,5 ml des Antigens, nach 10 Tagen 1,0 ml injiziert. Der KBR-Titer betrug nach 20 Tagen 1:512 und behielt auch am 60. Tag noch diesen Wert.

Bei gleicher Versuchsanordnung ergab eine Impfung mit geringerer Keimkonzentration ($1,6 \times 10^7$ Keime/ml) nach 20 Tagen nur einen Titer von 1:8 und nach 60 Tagen konnten spezifische komplementbindende Antikörper überhaupt nicht mehr festgestellt werden.

Auch FISET und ORMSBEE (1968) untersuchten die Antikörperantwort bei Meerschweinchen nach Immunisierung mit *Coxiella burnetii*. Experimentelle Infektion von Meerschweinchen mit Coxiellen der Phase I bewirkte 7 bis 10 Tage nach der Impfung das Auftreten von Antikörpern gegen Phase II-Antigen, während Antikörper gegen Phase I-Antigen erst 40 bis 60 Tage nach der Impfung nachweisbar waren.

FISET (1957) konnte nach einmaliger Impfung von Meerschweinchen mit 20 µg einer gereinigten Suspension abgetöteter Rickettsien (Stamm "Nine Mile", Phase I) Antikörper gegen Phase II-Antigen am 10. Tag nach der Immunisierung nachweisen. Das Titermaximum wurde am 20. Tag mit einem KBR-Titer von 1:128 erreicht. Der Titer fiel dann langsam bis zum 100. Tag bis auf 1:8 ab.

Bei der Immunisierung von Meerschweinchen mit einer gleich hergestellten Vakzine desselben Stammes in Phase II ergab sich folgender Titerverlauf: 10 Tage nach der Immunisierung waren Antikörper gegen Phase II mit einem KBR-Titer von 1:16 nachweisbar. Nach weiteren 20 Tagen war das Maximum (Titer 1:64) erreicht. 10 Tage lang blieb der Titer auf dieser Höhe, nach weiteren 55 Tagen waren komplementbindende Antikörper gegen Antigen der Phase II nicht mehr nachweisbar.

FISER (1957) untersuchte die Immunantwort bei Kaninchen, die mit einer Formolvakzine der Coxiellastämme "Nine Mile" und "Christie" immunisiert wurden. Ausgangspunkt war eine gereinigte Rickettsiensuspension, die im ml 2×10^{13} Coxiellen (Phase II) enthielt. Die Impfungen wurden mit einer 10^{-3} Suspension dieses Antigens, das mit Formalin behandelt wurde, durchgeführt. Auf die erste Injektion von 1,0 ml, die intravenös appliziert wurde, folgten in je 2-tägigem Abstand 2 Injektionen von je 0,5 ml, die subkutan gespritzt wurden. 125 Tage nach der ersten Impfung wurden 1,0 ml desselben Antigens subkutan verabreicht.

Die Untersuchung der Seren in der KBR ergab einen schnellen Titeranstieg, der am 15. Tag nach der ersten Immunisierung sein Maximum mit einem Titer von 1:640 erreichte. Bis zum 50. Tag blieb der Titer auf dieser Höhe und fiel dann langsam bis zum 125. Tag auf 1:160 ab. Nach der Boosterinjektion kam es zu einem erneuten Titeranstieg, der am 160. Tag, also 35 Tage nach der Boosterung, sein Maximum von 1:2560 erreichte. Bis zum Versuchsende (190. Tag) blieb der Titer auf dieser Höhe.

Über die Immunisierung weißer Mäuse und wilder Nager berichtet SIDEWELL (1962). Die Impfung wurde mit dem *Coxiella burnetii* Stamm "California AD²²" durchgeführt, der aus Milch infizierter Kühe in Los Angeles isoliert wurde und in der 25. Eipassage (Phase II) vorlag. Nach Impfung mit lebenden Erregern traten sowohl bei weißen

Mäusen als auch bei wilden Nagern ein bis zwei Wochen nach intraperitonealer Impfung von 0,2 ml 10^{-5} verdünntem infiziertem Dottersackmaterial Antikörper gegen Phase II-Antigen auf. 3 Wochen nach der Impfung war das Titermaximum erreicht, und lag bei weißen Mäusen bei einem Titer von 1:2048, bei wilden Nager zwischen 1:128 und 1:1024.

Nach Impfung mit abgetöteten Erregern (Formolvakzine, 10^{-5} Suspension aus infiziertem Dottersackmaterial, einmal 0,2 ml i.p.) wurden komplementbindende Antikörper bei weißen Mäusen nach einer Woche nachgewiesen, die ihr Maximum in der dritten bis sechsten Woche nach der Impfung mit Titerwerten zwischen 1:16 und 1:32 erreichten. Auch bei wilden Nagern lagen zwischen der dritten und fünften Woche die höchsten Titerwerte bei 1:32. Mit Ausnahme der "Desert Wood Rats", bei denen 36 Wochen nach der Impfung noch ein Antikörpertiter von 1:16 nachgewiesen wurde, konnten in der achten Woche bei den übrigen untersuchten Nagern komplementbindende Antikörper nicht mehr festgestellt werden.

2.8. Diagnose des Q-Fiebers

Beim Menschen wird der Verdacht für das Vorliegen einer Q-Fieber-Erkrankung oft schon auf Grund des klinischen Bildes gestellt. Bei Haustieren dagegen verläuft die Infektion meist völlig inapparent. Für die Diagnostik sind deshalb stets Laboratoriumsmethoden anzuwenden.

Zur Verfügung stehen:

- a) Der direkte mikroskopische Erregernachweis im Untersuchungsmaterial oder die Isolierung nach Züchtung im bebrüteten Hühnerei oder im Tierversuch.
- b) Der indirekte Erregernachweis mit serologischen Methoden.

2.8.1. Mikroskopischer Nachweis

In gefärbten Präparaten läßt sich der Erregernachweis verhältnismäßig leicht führen. Streng gram-positiv verhalten sich Coxiellen bei der nach GIMENEZ (1965) modifizierten Gramfärbung.

Bei der May-Grünwald-Färbung halten Coxiellen sowohl Eosin als auch Azur II zurück und zeigen verschiedene Purpurschattierungen (WEISS und PIETRYK 1956). SOTOW (1961) modifiziert die Macchiavello-Färbung, bei der die Coxiellen rot erscheinen. Die Stamp-Färbung wird von SCHAAL (1972) für den Coxiellennachweis empfohlen.

Ein anderer Nachweis ist durch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung möglich. URBACH und SPRÖSSIG (1954) färbten Coxiellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Auramin) an. Mit der Immunfluoreszenz konnten BECHT (1965), POSPISIL (1966), WAGNER (1967) und AMOSENKO (1964) Coxiellen nachweisen.

2.8.2. Anreicherung des Erregers im Brutei

Zur Erregerisolierung werden 6 - 7 Tage vorbebrütete embryonierte Hühnereier verwendet. Das Untersuchungsmaterial wird in den Dottersack verimpft, die überlebenden Embryonen 12 Tage post infectionem abgetötet und Dottersackzellen und Dotterflüssigkeit mikroskopisch auf Coxiellen untersucht (SCHAAL 1972).

2.8.3. Anreicherung des Erregers im Versuchstier

Für den Tierversuch ist das Meerschweinchen das Versuchstier der Wahl. Intraperitoneale, intramuskuläre, intrapulmonale, intratestikuläre oder subkutane Injektionen bewirken Krankheitserscheinungen, die nach intraperitonealer Applikation des Untersuchungsmaterials am frühe-

sten und sichtbarsten auftreten. Meist setzt am 3. - 9. Tag eine Temperaturerhöhung um 1 - 2°C ein, die mehrere Tage bestehen bleibt (HERZBERG und URBACH 1950, RECZKO 1950). Der Zeitpunkt des Fiebereintritts richtet sich nach der Dosis und Virulenz des infektiösen Materials, als unspezifisch muß jedoch ein Temperaturanstieg während der ersten 24 Stunden angesehen werden.

Auf dem Höhepunkt der Erkrankung werden die Tiere getötet. Pathologisch-anatomisch ist eine vergrößerte Milz von brüchiger Konsistenz zu erkennen, ihre Oberfläche ist als Folge einer Perisplenitis grau und leicht angeraut. In der Milzpulpa kommt es zu starken diffusen Retikulumzellwucherungen. Fluoreszenzmikroskopisch lassen sich in den Milzausstrichen intrazelluläre Zysten nachweisen, die mit pleomorphen Coxiellen angefüllt sind. Nach sub- oder intrakutaner Infektion kann man auch im entzündlichen Exsudat der sich bildenden Hautverdickung Coxiellen feststellen (COX 1940).

Der Erregernachweis ist nach HALLMANN (1961) aussichtsreicher, wenn die Milz des infizierten Meerschweinchens mit Ringerlösung im Verhältnis 1:3 aufgeschwemmt wird und eine Anreicherung der Coxiellen durch Mäusepassagen erfolgt. Die Diagnose erfolgt hierbei durch Nachweis der Coxiellen in gefärbten Milztupferpräparaten der nach 5 - 7 Tagen getöteten Maus.

HERZBERG (1950) kürzte die Tierversuche ab, indem er gleichzeitig vorher immunisierte und nicht immunisierte Meerschweinchen infizierte. Bekamen nur die nicht infizierten Tiere Fieber, galt die Q-Fieber-Diagnose als gesichert.

Neben Meerschweinchen fanden auch die weiße Maus, das Kaninchen und der Hamster als Versuchstiere für die Q-Fieber-Diagnose Verwendung. Weiße Mäuse erkrankten nicht klinisch, die Diagnose erfolgt durch Nachweis der Erreger in Milzabklatschpräparaten sowie durch serologische Untersuchungen (HERZBERG 1947, IMHÄUSER 1948, NAUCK und WEYER 1948, BOCK 1954).

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Coxiellen bietet die "Xenodiagnose" (WEYER 1949, 1951/52, GEIGY 1951). Zur Erregerisolierung wurden als Versuchstiere Zecken (*Ornithodoros moubata*) zum Blutsaugen auf die Haut der erkrankten Patienten (Mensch, Haustier) gesetzt. Nach 20 Tagen wurden aus Magen und Darm der Zecken hergestellte Quetschpräparate auf Coxiellen untersucht (REUSSE 1960).

2.8.4. Komplementbindungsreaktion

Für die Routinediagnostik spielen serologische Reaktionen wegen ihrer einfacheren Handhabung eine dominierende Rolle. Die am häufigsten durchgeführte Untersuchung ist die Komplementbindungsreaktion (KBR), die erstmalig von BENGSTON 1940 zur Q-Fieber-Diagnose angewendet wurde.

Nach Auffassung der WHO ist die KBR das diagnostische Standardverfahren. Die Untersuchung wird zumeist in der als Kältebindung bekannten Technik nach COLMER (1941) außerdem in der Wärmebindung durchgeführt.

Nach den Erfahrungen von SCHAAL (1972) bringt die Kältebindung, bei zwar höherem Komplementbedarf, gegenüber der Wärmebindung höhere Grenztiter. Demgegenüber erreichte FEYA (1970) bei der Untersuchung von menschlichen Seren Übereinstimmung im Ergebnis des Kälte- und Wärmebindungsverfahrens und gab deshalb wegen der geringeren Versuchsdauer der Wärmebindung den Vorzug.

Die KBR auf Q-Fieber ist streng spezifisch, Kreuzreaktionen mit anderen Krankheiten treten nicht auf.

Außer mit Blutserum wurde die KBR mit Milchsera und mit Spinalflüssigkeit durchgeführt (BABUDIERI, 1951). Titer von 1:8 werden als zweifelhaft, solche von 1:16 und höher als positiv beurteilt (LIPPELT 1949). Komplementbindende Antikörper treten beim Menschen frühestens zu Beginn der zweiten Krankheitswoche auf. Der maximale Titer wird nach SIEGERT (1952) in der fünften bis zehnten Krankheitswoche erreicht.

Bei Rindern und Schafen liegt nach SCHAAL (1972) ein positiver KBR-Befund vor, wenn bei einer Serumverdünnung von 1:20 eine vollständige Hämolysehemmung eingetreten ist. Beim Meerschweinchen kann jedoch bereits eine komplette Hämolysehemmung in der Verdünnungsstufe 1:5 als Infektionstiter angesehen werden.

Antigene für die KBR wurden aus Dottersäcken mit *Coxiella burneti* infizierten Hühnerembryonen (HERZBERG, KREMMER, URBACH 1950, HERZBERG 1951), der Milz infizierter Meerschweinchen (BENGSTON 1941) und Mäuse (STERNGOLD 1962) sowie aus beimpften Zellkulturen hergestellt.

Neben Kochextraktion (LINDE 1962) wurde besonders die Ätherextraktion (SIEGERT 1951) zur Antigenaufbereitung angewendet. Außerdem erfolgte die Reinigung mit Hilfe der Dichtegradienten-Zonenzentrifugation (RIBI 1960). Mit den genannten Methoden wurden jeweils korpuskuläre Antigene gewonnen.

Über die Gewinnung eines löslichen Antigens durch Ultraschallbehandlung berichtete URAKOV (1962). Es zeigte jedoch gegenüber korpuskulären Antigenen eine 1,5 bis 3-fach schwächere Reaktion. Auch die Versuche von ORMSBEE (1953) und FEDOROVA (1965) zur Gewinnung eines löslichen Antigens durch Ätherextraktion brachten nicht die gewünschten Ergebnisse, denn es wurde nur eine geringe Antigenausbeute erhalten.

ORMSBEE und Mit. (1953) gelang es schließlich, aus Rickettsien der Phase I, die im Unterschied zur Phase II ein Oberflächenpolysaccharid-Antigen besitzen, mit den organischen Lösungsmitteln Dimethylsulfoxid und Dimethylazetamid ein für die KBR brauchbares lösliches Antigen herzustellen.

Weiterhin konnte KUDELINA (1969) durch Behandlung von Coxiellen der Phase I mit Trichloressigsäure aus der Oberfläche der Rickettsienmembran Polysaccharid-Protein-Partikel freisetzen. Dadurch wurde eine lösliche Frak-

tion gewonnen, die die gleiche Antigenaktivität wie das korpuskuläre Antigen aus Phase I des benutzten Stammes "Sorseev" besaß und außerdem für die KBR Verwendung finden konnte.

Nach Auffassung von LUDWIG (1968) sind der während des zweiten Weltkrieges in Italien isolierte Stamm "Henzerling" und der 1938 in Montana (USA) isolierte Stamm "Nine Mile" am besten für die KBR geeignet.

2.8.5. Agglutinationsreaktionen

Die Agglutination wurde 1937 als erste serologische Reaktion zur Diagnose des Q-Fiebers von BURNET und FREEMANN angewendet. Neben diesem in Röhrchen durchgeführten Verfahren sind später zahlreiche Modifikationen der Agglutination entwickelt worden, sowohl makroskopische als auch mikroskopische Methoden.

Makroskopische Verfahren

Hier ist der Kapillar-Agglutinationstest nach LUOTO zu erwähnen (LUOTO 1964). Diese Reaktion dient der Prüfung von Milch oder Seren auf das Vorhandensein agglutinierender Antikörper. Wird die Reaktion mit Milch als Capillar-Ring-Test (CRT) ausgeführt, handelt es sich im Prinzip um das Verfahren der Abortus-Bang-Ringprobe (SCHAAL 1972). Das Phasenphänomen spielt bei der Herstellung des Luoto-Antigens eine wichtige Rolle, da das Antigen für diesen Versuch angefärbt wird. Antigene der Phase II flocken beim Zusatz des Farbstoffes Hämatoxilin spontan aus, weshalb sich ihre Verwendung verbietet.

BECHT (1965) zeigte an acht Stämmen von *Coxiella burnetii*, daß nur Rickettsien der Phase I mit Hämatoxilin angefärbt und zu einem brauchbaren Antigen für den Capillar-agglutinationstest (CAT) nach Luoto verarbeitet werden können. Im europäischen Raum hat nur die Firma Veteri-

narla-AG Zürich die Produktion dieses Antigens aufgenommen (SCHAAL 1972).

Da der CAT eine arbeitstechnisch einfache Methode ist, ergibt sich für die Tierseuchenbekämpfung die Möglichkeit, größere Bestände auf Q-Fieber zu untersuchen (HESS und BECHT 1964). Die Genauigkeit des Nachweises ist sehr groß, denn SCHAAL (1972) stellte bei Vergleichsuntersuchungen von Erregerisolierung aus Milch und deren Untersuchung im CAT eine Übereinstimmung in 94,4 % der untersuchten Proben fest.

Mikroskopische Verfahren

HAAS (1952) berichtete über eine Mikroagglutinationstechnik zur Serodiagnose des Q-Fiebers. Der Agglutinationsvorgang im hängenden Tropfen spielt sich hierbei in einer geschlossenen Kammer aus Hohlschliffobjektträger und Deckglas innerhalb von 2 Stunden bei 37°C ab. Die Ableseung erfolgt im Mikroskop mit Dunkelfeldkondensor bei Lupevergrößerung.

Diese Methode, die neben der KBR auch von den Behring-Werken für ihr handelsübliches Q-Fieber-Antigen empfohlen wird, bringt den Vorteil einer Antigensparnis, da nur eine Öse Antigen zur Untersuchung jeweils einer Serumverdünnung benötigt wird. Nach SCHAAL (1972) ist die Reaktion bei Verwendung des gefärbten Luoto-Antigens deutlicher ablesbar.

2.8.6. Weitere Nachweismethoden

Andere serologische Nachweismethoden wie der Opsonintest und der Konglutinations-Komplement-Absorptionstest sind zu aufwendig und finden in der praktischen Diagnostik keine Anwendung. Nach TABERT (1965) zeigen sie zwar höhere Empfindlichkeit als KBR und CAT bei der Untersu-

chung humaner Seren, für Tierseren trifft dies jedoch nicht zu.

Auch die allergischen Proben, die beim Menschen als Intrakutanprobe und beim Tier als Palpebratest angewendet werden können, besitzen keine praktische Bedeutung, da sie erst später als die serologischen Untersuchungen ein positives Ergebnis anzeigen (BABUDIERY und RAVAIOLI 1951).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methode

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 47 Kaninchen verwendet, die bei Versuchsbeginn ein Gewicht von ca. 2,5 kg hatten und etwa 4 Monate alt waren. Die Tiere wurden in Buchten zu ca. 10 Tieren gehalten. Das Futter bestand aus Pellets und Wasser. Die Kennzeichnung der Tiere wurde mit der Tätowierzange vorgenommen.

3.1.2. Antigene

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden formalininaktivierte Aufschwemmungen von *Coxiella burneti* verwendet.⁺⁾ Sie waren durch Ätherextraktion aus Dottersäcken mit *Rickettsia burneti* infizierter Hühnereier hergestellt. Der Erreger stammt aus einer hohen Dottersackpassage (70. Passage), so daß es sich um ein Antigen der Phase II handelt. Als Konservierungsmittel diente gepufferte physiologische NaCl-Lösung, zum Abtöten der Rickettsien wurde Formaldehyd (0,035 g/ml) zugesetzt. Die Antigene wurden während der Dauer der Versuche bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Antigen enthielt pro ml ca. 10^{11} Rickettsien. Dieser Wert wurde durch Anfärben des Antigens mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gefärbtem Konjugat und anschließender mikroskopischer Auszählung nach dem Verfahren von BREED ermittelt.

⁺⁾ Den Behringwerken AG Marburg/Lahn wird für die Überlassung der erforderlichen Antigenmengen bestens gedankt.

Zwei verschiedene Antigene standen zur Verfügung:

- a) Ein Mischantigen aus gleichen Teilen der Stämme "Nine Mile" und "Henzerling" (Versuchsreihe I)
- b) Ein Antigen des Stammes "Henzerling" (Versuchsreihe II).

Für die Immunisierung der Kaninchen wurden die Ausgangs-suspensionen mit physiologischer NaCl-Lösung auf eine 2,5%ige Verdünnung eingestellt, d. h. pro ml waren ca. $2,5 \times 10^9$ Coxiellen enthalten.

Ein Teil der Versuchstiere erhielt diese wässrige Antigen-zubereitung, der andere Teil ein Gemisch von wässrigem Antigen und komplettem Freund'schen Adjuvans.

3.1.3. Adjuvans

Als Adjuvans wurde komplettes Freund'sches Adjuvans der Firma Difco verwendet, bei dem es sich um eine Wasser in Öl Emulsion mit folgenden Bestandteilen handelt:

Paraffinöl: Bajol F
Emulgatorsubstanz: Arlacel A
Mycobacterium butyricum (1 mg Trockengewicht/ml)

Die Homogenisierung erfolgte durch mehrmaliges Durchmischen des kompletten Freund'schen Adjuvans mit der 2,5-%igen Antigensuspension. Das Volumenverhältnis beider Anteile betrug 1:1. Die Durchmischung wurde mit Hilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (Nr. 1) vorgenommen. Das Adjuvansantigen enthielt pro ml ca. $1,25 \times 10^9$ Coxiellen.

3.1.4. Immunisierungsverfahren

Die Immunisierungsversuche wurden in zwei Abschnitten durchgeführt.

In der Versuchsreihe I (27 Kaninchen) wurde zur Immunisierung Mischantigen der Stämme "Nine Mile" und "Henzerling" ohne oder mit Zusatz von komplettem Freund'schen Adjuvans verwendet.

In der Versuchsreihe II (18 Kaninchen) wurde Antigen des Stammes "Henzerling" ohne oder mit Zusatz von komplettem Freund'schen Adjuvans benutzt.

Genaue Einzelheiten der Immunisierungen innerhalb der Versuchsreihen, die jeweils wieder in 9 bzw. 6 Gruppen unterteilt wurden, sind in Tabelle 1 und 2 zusammengestellt.

3.1.5. Blutentnahme

Allen Kaninchen wurde vor Versuchsbeginn und später regelmäßig mindestens wöchentlich bis zum Ende der Versuche 2 - 3 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Dazu wurden innen polierte Kanülen (Nr. 1) benutzt.

3.1.6. Antikörperbestimmung in der Komplementbindungsreaktion (KBR)

Der Nachweis der nach der Immunisierung gebildeten Antikörper erfolgte laufend mit Hilfe der KBR.

Serumgewinnung:

Die Blutproben wurden nach der Gerinnung bei 2000 U/min. zentrifugiert, und das gewonnene Serum im Verhältnis 1:5 (0,2 + 0,8) mit steriler physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und anschließend 30 Min. im Wasserbad bei 62°C inaktiviert.

Tab. 1: Versuchsreihe I

Immunisierung von Kaninchen mit *Coxiella burnetii* (Stämme "Nine Mile" u. "Henzerling")

Gruppe	Tag der Immunisierung (Versuchstag)									
	1	3	6	10	13	25	32	53	68	77
1	Ag + FA 1,0 is.	Ag + FA 1,0 is.	Ag + FA 1,0 is.	—	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.
2	Ag 0,5 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,5 iv.	Ag 2,0 iv.	Ag 2,5 iv.	Ag 3,0 iv.	Ag 2,0 iv.	Ag 2,0 iv.	Ag 3,0 iv.	Ag 2,0 iv.
3	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 2,0 iv.
4	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 2,0 sc.	Ag + FA 4,0 im.
5	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 1,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.
6	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 1,0 sc.	Ag 2,0 im.
7	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 1,0 iv.	Ag 2,0 sc.
8	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 2,0 im.	Ag + FA 4,0 im.
9	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.	Ag 2,0 ip.

Erklärung: FA = Freund'sches Adjuvans (komplett)

Ag = Antigen suspension

Angaben in ml

Tab. 2: Versuchsreihe II

Immunisierung von Kaninchen mit *Coxiella burneti* (Stamm "Henzerling")

Gruppe	Tag der Immunisierung (Versuchstag)			
	1.	4.	9.	100.
1	1,0 s.c. Ag.	1,0 s.c. Ag.	1,0 s.c. Ag.	2,0 i.p. Ag.
2	2,0 s.c. FA + Ag.	2,0 s.c. FA + Ag.	2,0 s.c. FA + Ag.	2,0 i.v. Ag.
3	2,0 i.m. FA + Ag.	2,0 i.m. FA + Ag.	2,0 i.m. FA + Ag.	2,0 i.p. Ag.
4	1,0 i.v. Ag.	2,0 i.m. FA + Ag.	2,0 i.m. FA + Ag.	3,0 i.p. Ag.
5	2,0 i.p. Ag.	2,0 i.p. Ag.	2,0 i.p. Ag.	4,0 i.p. Ag.
6	-	1,0 i.s. FA + Ag.	1,0 i.s. FA + Ag.	2,0 i.v. Ag.

FA = Freund'sches Adjuvans

Ag. = Antigen

Angaben in ml

Komplement:

Serum von männlichen Meerschweinchen wurde gepoolt, in 2 ml Portionen aufgeteilt und bei -70°C eingefroren. Vor jedem Versuch wurde die Gebrauchsdosis in einer Komplementauswertung ermittelt.

Antigen:

Als Antigen wurden handelsübliche Chargen der Behringwerke bezogen. Es war aus Dottersäcken mit *Coxiella burneti* (Stamm "Nine Mile" und "Henzerling") infizierter Hühnereier hergestellt. Vor Gebrauch wurde es nach Anweisung mit physiologischer NaCl-Lösung 1:10 verdünnt.

Hämolytischer Ambozeptor:

Der hämolytische Ambozeptor (Anti-Schafblutkörperchen-serum vom Pferd) wurde von den Behringwerken/Marburg bezogen. Er hatte einen Titer von 1:4000. Die verwendete Gebrauchslösung war die Verdünnung 1:1000.

Hammelblutkörperchen:

Ein Teil Hammelblut wurde zu einem gleichen Teil steriler Alsever-Lösung gegeben. Das Hammelblut war bei Gebrauch mindestens 24 Stunden alt, jedoch nie älter als 10 Tage.

Hämolytisches System:

Alsever-Blut wurde mit physiologischer NaCl-Lösung so oft gewaschen, bis der Überstand klar war. Mit den reinen Erythrozyten wurde mit physiologischer NaCl-Lösung eine 2%ige Erythrozytenaufschwemmung hergestellt und mit gleichen Teilen der Gebrauchslösung des hämolytischen Ambozeptors zusammengegeben. Das so hergestellte hämolytische System war nach 20 Min. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur gebrauchsfertig.

Durchführung der KBR in der Mikromethode nach TAKATSY:

Die Mikromethode hat der klassischen Röhrchen-KBR gegenüber den Vorteil, mit einer zehnfach reduzierten Reagenzienmenge zu arbeiten.

Vergleichende Untersuchungen von Röhrchen- und Mikromethode erbrachten keine nennenswerten Unterschiede im Ausfall der Reaktion.

Das Arbeitsbesteck für die Mikromethode stammt von der Fa. Flow Laboratories.

Der Mikrotiter-Gerätesatz besteht aus folgenden Teilen:

1. U-Platten für den einmaligen Gebrauch
2. Tropfpipetten (0,025 ml)
3. Mikroverdünner (0,025 ml)
4. Filterpatronen für die Tropfpipetten
5. Teststreifen zur Volumenkontrolle der Mikroverdünner
6. Klebeband zum Verschließen der U-Platten

KBR-Vorversuch:

Vor der Durchführung jedes Hauptversuches wurde ein Komplementvorversuch mit abgestuften Komplementmengen angesetzt, um zu testen, bei welcher geringsten Komplementmenge noch eine Hämolyse der zugesetzten Schaferythrozyten stattfand.

Der Versuch wurde mit zwei Verdünnungsreihen in Röhrchen durchgeführt:

1. NaCl-Reihe 15 Röhrchen
Komplementverdünnung + hämolytisches System
2. Antigen-Reihe 15 Röhrchen
Komplementverdünnung + Antigen-Gebrauchslösung
+ hämolytisches System

Dadurch wurde der Komplementverbrauch des Antigens oder antikomplementäre Antigeneigenschaften ermittelt.

Bei der Herstellung der Komplementverdünnung (C'-Verd.) wurde auf eine engstufige Verdünnung besonderen Wert gelegt, wie die folgende Tabelle zeigt.

C'- Verd.	C' 1:10	NaCl 0,9 %
6,00 %	0,6	0,4
5,00 %	0,5	0,5
4,00 %	0,4	0,6
3,50 %	0,35	0,65
3,25 %	0,325	0,675
3,00 %	0,3	0,7
2,75 %	0,275	0,725
2,50 %	0,25	0,75
2,25 %	0,225	0,775
2,00 %	0,2	0,8
1,75 %	0,175	0,825
1,50 %	0,15	0,85
1,25 %	0,125	0,875
1,00 %	0,1	0,9
0,75 %	0,075	0,925

Angaben in ml

Zu der jeweiligen Komplementverdünnung wurden 0,25 ml physiologische NaCl-Lösung (NaCl-Reihe) oder 0,25 ml Antigen-Gebrauchsverdünnung (Antigen-Reihe) gegeben.

Nach 45 Minuten Bindungszeit im Wasserbad (37°C) erfolgte die Zugabe des hämolytischen Systems (0,5 ml pro Röhrchen). Anschließend wurden die Röhrchen eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert (Wasserbad). Nach Zentrifugation der Röhrchen bei 3000 U/min. konnte die Reaktion abgelesen werden.

Die Komplementkonzentration, die noch eine 100%ige Lysis der Erythrozyten bewirkte, wurde als eine Komplementeinheit gesetzt. Komplement, das erst in einer Konzentration über 3 % eine vollständige Hämolyse der sensibilisierten Erythrozyten bewirkte, wurde nicht im Hauptversuch verwen-

det. Eine Komplementeinheit des verwendeten Komplementes entsprach im Mittel einer C'-Konzentration von 1,5 %.

Vorversuch nach der Mikromethode:

Die Mikromethode unterscheidet sich im Prinzip ihrer Durchführung nicht von der Röhrenchenmethode, die Menge der benötigten Reagentien betrug jedoch nur 1/10 der oben angegebenen Dosen. Die Ablesung der Reaktion erfolgte ebenfalls nach Zentrifugation (3000 U/min.) der U-Platten.

KBR-Hauptversuch:

Die Kaninchenserum, sowie die positiven und negativen Kontrollserum wurden vor Versuchsbeginn mit physiologischer NaCl-Lsg. 1:5 verdünnt und anschließend 30 Minuten bei 62°C im Wasserbad inaktiviert.

Der Ansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Vertiefung	1	2	3	4	5	6
NaCl-Lsg.	0,025	0,025	-	0,025	0,025	0,025
Serum 1:5	0,025	0,025	0,025	0,025	-	-
	nach der Serumverdünnung			→ → →		
	Zugabe von					
Antigen	0,025	-	0,025	0,025	0,025	0,025
Komplement	-	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025

Angaben in ml

Das Einfüllen des Serums erfolgte mit Blutzuckerpipetten (0,1 ml). Antigen, Komplement, NaCl-Lsg. und hämolytisches System wurden mit einer geeichten Tropfpipette (Volumen pro Tropfen 0,025 ml) eingefüllt.

In Vertiefung 1 und 2 wurden für jedes einzelne Serum Kontrollen angesetzt. Vertiefung 1 enthielt neben dem jeweiligen Serum Antigen, jedoch kein Komplement (keine Hämolyse der später zugesetzten Erythrozyten), Vertiefung 2 enthielt neben dem jeweiligen Serum Komplement,

jedoch kein Antigen (vollständige Hämolyse der später zugesetzten Erythrozyten).

Die Verdünnungsreihen (Vertiefung 3 - 6 und weiter) wurden mit Hilfe der Mikroverdünner (Volumen 0,025 ml) angesetzt. Dabei wurden je 0,025 ml von der 4. Vertiefung bis zur letzten Vertiefung der Reihe übertragen. Die zuverlässige Füllung des Mikroverdünners war durch seine mehrfache Rotation in den Vertiefungen gewährleistet. Der nach dem letzten Verdünnungsschritt im Mikroverdünner verbliebene Rest wurde verworfen. Eine Vereinfachung bei der Anfertigung mehrerer Verdünnungsreihen wurde durch den Multi-Mikro-Verdünner erreicht, an dem bis zu 12 Mikroverdünner befestigt werden konnten.

Die Volumenkontrolle der Mikroverdünner wurde mit speziellen Teststreifen aus löschpapierartigem Material (Go-no-Go Tester) ausgeführt. Eine ordnungsgemäße Füllung des Diluters lag vor, wenn die durch Kapillarkräfte in das Filter eingesaugte Testflüssigkeit (0,9%ige NaCl-Lsg.) eine genau festgesetzte Fläche ausfüllte.

Nach Herstellung der Serumverdünnungsreihe erfolgte die Zugabe von

0,025 ml Antigen in Gebrauchsverdünnung

0,025 ml Komplement in 2,1facher Konzentration der
im Vorversuch ermittelten Komplementeinheit.

Nach Vermischung der Reagentien mit einem elektrischen Schwingungserzeuger wurden die Platten aufeinandergestellt, womit eine Evaporation verhindert wurde, und für 15 bis 18 Stunden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt (Kältebindung).

Im nächsten Arbeitsgang wurde 0,05 ml hämolytisches System in jede Vertiefung pipetiert. Mit einer Klebefolie wurden die Platten hermetisch verschlossen und 35 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach abschließender Zentrifugation der Platten wurden die Reaktionen ausgewertet. Zur Vereinfachung des Ablesens diente ein Ablesespiegel, dessen Plattenaufnahmefläche zur schnellen Kennzeichnung der einzelnen Reihen nummeriert und spiegelbildlich korrigiert war.

Kontrollen:

Neben den Seren der Versuchstiere wurde ein positives Q-Fieber-Serum mit bekanntem Antikörpergehalt und ein negatives Serum als Kontrolle untersucht.

Zusätzlich wurde für jeden Ansatz noch eine

Antigenkontrolle (0,025 ml Antigen + 0,05 ml NaCl-Lsg.) und eine

Komplementkontrolle (0,025 ml Komplement + 0,025 ml Antigen + 0,025 ml NaCl-Lsg.)

mitgeführt.

Bewertung des Reaktionsausfalles der KBR:

- ++++ keine Hämolyse, scharf abgesetzter roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit wasserklar.
- +++ schwache Hämolyse, deutlich roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit rosafarben.
- ++ 50%ige Hämolyse, geringer Bodensatz, überstehende Flüssigkeit rot.
- vollständige Hämolyse, kein Bodensatz, Flüssigkeit lackfarben.

Als Endtiter wurden nur die Serumverdünnungen berücksichtigt, bei denen eine ++++ Reaktion eingetreten war, also eine vollständige Bindung des zugesetzten Komplements stattgefunden hatte.

Vor Versuchsbeginn wurden sämtlichen Kaninchen Blutproben entnommen und die daraus gewonnenen Seren in der Komplementbindungsreaktion untersucht. Bei keinem der Tiere wurden komplementbindende Antikörper festgestellt.

In beiden Versuchsreihen wurden Kaninchen mitgeführt, die nicht immunisiert worden waren und somit als negative Kontrolltiere dienten.

Zur Prüfung der Frage, ob Dottersackmaterial die Spezifität der Q-Fieber-KBR möglicherweise beeinflusst, wurden zwei Kaninchen mit je 2,0 ml einer 2,5%igen Suspension eines unbeimpften Dottersackes, der analog den infizierten Dottersäcken aufbereitet worden war, dreimal im Abstand von 4 Tagen subkutan gespritzt. Mehrmalige Serumuntersuchungen zwischen der 1. und 12. Woche nach der ersten Injektion der Versuchstiere in der KBR mit handelsüblichem Q-Fieber-Antigen zeigten stets ein negatives Ergebnis. Daraus geht hervor, daß nicht mit einer Unspezifität durch Dottersackmaterial gerechnet werden mußte.

Errechnung der Durchschnittstiter einer Gruppe:

Zu jeder Versuchsgruppe gehörten 3 Kaninchen, die in jeweils gleicher Weise immunisiert worden waren. Um eine Aussage über die Wirksamkeit der verschiedenen Impfmethoden machen zu können, wurde, ausgehend von den Einzelergebnissen jedes Tieres der Durchschnittstiter (ϕ -Titer) einer Gruppe errechnet.

$$\phi\text{-Titer} = \frac{\text{Summe der Einzeltiter}}{\text{Anzahl der Tiere einer Gruppe}}$$

3.1.7. Behandlung der Seren mit 2-Mercaptoäthanol (2-MÄ)

Die Reduktion des Serums mit 2-MÄ wurde bei sämtlichen von den Tieren der Versuchsreihe II gewonnenen Seren durchgeführt. Die reduzierten Seren wurden jeweils gleichzeitig mit den unbehandelten Seren in der Komplementbindungsreaktion untersucht.

Die Seren wurden mit gepufferter 0,85%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:5 verdünnt und 30 Minuten bei 62°C inaktiviert. Zu 1,0 ml dieser Serumverdünnung wurde aus einer 27gg Kanüle 1 Tropfen von mit Aqua dest. 1:4 verdünnten 2-MÄ gegeben, es entstand so eine ca. 0,2 molare Konzentration von 2-MÄ.

Dieses Gemisch wurde danach 30 Minuten bei 37°C gehalten und anschließend in der Komplementbindungsreaktion untersucht.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Immunisierung in Bezug auf die Bildung komplementbindender Antikörper sind für die Versuchsreihe I in den Abb. 1 und 2 sowie in Tabelle 3, für Versuchsreihe II in den Abb. 3 und 4 sowie in Tabelle 4 dargestellt (Tab. 3 S. 49, Tab. 4 S. 50, Abb. 1-4 S. 52-55).

Die Ergebnisse der Bestimmung des IgM- und IgG-Anteils der Seren der Versuchsreihe II sind in Tab. 4 dargestellt (S. 50).

Impfreaktionen lokaler oder allgemeiner Art waren bei allen Tieren, die mit reiner Antigensuspension immunisiert wurden, nicht festzustellen.

Nach Injektion von Antigen mit komplettem Freund'schen Adjuvans war nach subkutaner und intrasolearer Applikation an der Injektionsstelle eine geringgradige Umfangsvermehrung aufgetreten. Weitere Anzeichen einer Entzündung waren klinisch nicht feststellbar.

Das Allgemeinbefinden (Futter- und Wasseraufnahme, Körpertemperatur) blieb nach den Injektionen bei allen Tieren unverändert.

4.1. Versuchsreihe I

Versuchsgruppe 1

Immunisierung:

3-malige Injektion von 0,5 ml Antigen mit je 0,5 ml Freund'schem Adjuvans (FA) intrasolear.

6-malige Injektion von 1,0 ml Antigen intravenös.

Boosterung mit 2,0 ml Antigen intravenös.

Immunantwort:

6 Tage nach der Erstimmunisierung wurde ein Titer von 1:5 nachgewiesen. Ein weiterer Titeranstieg wurde 4 Tage später festgestellt (Titer 1:60). Nach leichtem Titerabfall wurde von 13. bis zum 102. Versuchstag ein unveränderter Titer von 1:40 nachgewiesen. Innerhalb der folgenden 6 Tage sank der Titer um eine Stufe auf 1:20 und blieb bis zum 137. Versuchstag auf dieser Höhe. In den nächsten 14 Tagen zeichnete sich ein Titerabfall um zwei Stufen ab; dieser geringe Antikörpergehalt (Titer 1:5) war gleichbleibend bis zum 178. Versuchstag. Am 189. Versuchstag wurde ein Titer von 1:2,5 gemessen.

Ein Antikörper-Peak wurde 13 Tage später durch die Boosterinjektion erreicht. Nachdem 6 Tage nach dieser Injektion bereits Titer von 1:80 gemessen wurden, konnten am 202. Versuchstag Werte von 1:120 festgestellt werden. Von diesem Zeitpunkt an fiel der Titer kontinuierlich, so daß am 244. Tag (Versuchsende) nur ein Titer von 1:30 ermittelt wurde.

Versuchsgruppe 2

Immunisierung:

10-malige Injektion von Antigen in aufsteigender Dosierung 0,5 - 3,0 ml intravenöse.

Boosterung mit 2,0 ml Antigen intravenös.

Immunantwort:

Erstmalig wurden Antikörper (Titer 1:30) am 10. Tag nach Erstimmunisierung festgestellt. Ein leichter Titerabfall (Titer 1:20) zeigte sich am 13. und 17. Tag des Versuches. Bis zum 21. Tag stieg der Titer wiederum auf 1:30 und blieb mit leichten Abweichungen bis zum 102. Tag auf dieser Höhe. In der Folgezeit sank der Titer kontinuierlich, bis am 178. Tag komplementbindende Antikörper nicht mehr nachweisbar waren.

Auf die Boosterung am 189. Tag erfolgte ein Titeranstieg, der am 202. Tag sein Maximum (Titer 1:80) erreichte und von da ab kontinuierlich bis zum Versuchsende am 244. Tag auf 1:15 absank.

Versuchsgruppe 3

Immunisierung:

10-malige Injektion von 1,0 ml Antigen intraperitoneal.
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intravenös.

Immunantwort:

Ein Titer von 1:15 wurde 10 Tage nach der Erstimmunisierung ermittelt, nach weiterem Titeranstieg lag am 26. Versuchstag der Wert bei 1:120. Nach einem Titerabfall bis zum 60. Tag (Titer 1:40) war ein erneuter Titeranstieg zu verzeichnen, so daß am 102. Tag ein Titer von 1:160 ermittelt wurde. Von diesem Zeitpunkt ab wurde ein gleichmäßiger Titerabfall beobachtet, so daß am 189. Tag nur ein Titer von 1:5 feststellbar war.

Nach der Boosterung zeigte sich ein erneuter Titeranstieg, der 6 Tage nach der Injektion sein Maximum von 1:160 erreichte. Anschließend fiel der Titer bis zum Versuchsende (244. Tag) auf 1:20.

Versuchsgruppe 4

Immunisierung:

10-malige Injektion von 1,0 ml Antigen mit je 1,0 ml FA subkutan.

Boosterung mit 2,0 ml Antigen in 2,0 ml FA intramuskulär.

Immunantwort:

Während der ersten 14 Tage wurde ein langsamer Titeranstieg festgestellt (10. Tag: Titer 1:10; 13. Tag: Titer 1:30). Die weiteren Untersuchungen zeigten eine kontinuierliche Antikörperzunahme, so daß am 38. Tag nach der Erstimmunisierung ein Titer von 1:160, am 68. Tag von 1:240 erreicht war. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde eine Abnahme des Antikörpergehaltes festgestellt (75. Tag Titer 1:80), danach zeigte sich jedoch ein weiterer Titeranstieg, der am 102. Tag sein Maximum mit 1:480 erreichte. Innerhalb von 6 Tagen sank der Titer um mehr als eine Stufe auf 1:160 und blieb bis zum 137. Tag auf dieser Höhe. Von diesem Zeitpunkt an verminderte sich der Antikörpergehalt gleichmäßig, am 189. Tag wurde jedoch noch ein Titer von 1:25 gemessen.

Nach der Boosterinjektion am 189. Tag ließ sich ein Titeranstieg ablesen, der am 210. Tag, d. h. 21 Tage nach dieser Injektion, sein Maximum mit 1:280 erreicht. In den folgenden 8 Tagen sank der Titer auf 1:170 und blieb bis zum 244. Tag auf dieser Höhe.

Versuchsgruppe 5

Immunisierung:

2-malige Injektion von 1,0 ml Antigen subkutan,
5-malige Injektion von 1,0 ml Antigen intraperitoneal,
3-malige Injektion von 2,0 ml Antigen intraperitoneal,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Bereits 6 Tage nach der Erstimmunisierung war ein Titer von 1:5 feststellbar. Am 10. Versuchstag lag der Titer bei 1:15 und stieg dann gleichmäßig bis zum 46. Tag auf 1:150 an. Nach Titterschwankungen von nicht ganz einer Titerstufe wurde am 94. Tag, 17 Tage nach der letzten

Immunisierung, ein Antikörper-Peak mit einem Titer von 1:280 erreicht. Innerhalb der folgenden 14 Tage fiel der Titer auf 1:140, blieb auf dieser Höhe bis zum 137. Tag, um dann kontinuierlich bis zum 189. Tag auf 1:15 abzufallen.

Nach der Boosterung am 189. Tag zeichnete sich ein rascher Titeranstieg ab, der am 202. Tag sein Maximum von 1:240 aufwies. In den nächsten 8 Tagen wurde keine Veränderung des Antikörpergehaltes festgestellt. Von diesem Zeitpunkt bis zum Versuchsende wurde ein allmählicher Titerabfall ermittelt (244. Tag Titer 1:80).

Versuchsgruppe 6

Immunisierung:

10-malige Injektion von 1,0 ml Antigen subkutan,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intramuskulär.

Immunantwort:

Die Immunantwort war zunächst nur schwach (10. Tag Titer 1:7; 17. Tag Titer 1:10), danach stieg der Titer langsam an (38. und 46. Tag Titer 1:55). Nach einem leichten Titerabfall vom 52. bis 68. Tag konnte ein erneuter Titeranstieg ermittelt werden, der am 102. Tag das Maximum von 1:160 aufwies. Von diesem Zeitpunkt bis zum 189. Tag sank der Titer gleichmäßig bis auf 1:5 ab.

Nach der Boosterung am 189. Tag wurde 6 Tage später ein Titer von 1:50 abgelesen. Ein weiterer Titeranstieg erfolgte bis zum 218. Tag (Titer 1:120), danach sank der Titer bis zum Versuchsende auf 1:60.

Versuchsgruppe 7

Immunisierung:

10-malige Injektion von 1,0 ml Antigen intravenös,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen subkutan.

Immunantwort:

Antikörper traten erstmals am 6. Versuchstag auf (Titer 1:10). Nachdem am 26. Tag ein Titer von 1:80 festgestellt werden konnte, wurden von da ab bis zum 75. Tag Titer zwischen 1:40 und 1:50 gemessen. Nach der letzten Injektion am 77. Tag stieg der Titer innerhalb von 11 Tagen auf 1:120 und zeigte nach einem zwischenzeitlichen leichten Abfall auch am 102. Tag diesen Wert. Von diesem Zeitpunkt an war ein gleichmäßiger Titerabfall zu beobachten, bis am 189. Tag Antikörper nicht mehr nachzuweisen waren.

Nach der Boosterung am 189. Tag wurde eine Antikörperzunahme gemessen, die sich 6 Tage nach dieser Injektion in einem Titer von 1:40 zeigte. Nach weiteren 7 Tagen, am 202. Tag betrug der Titer 1:80. Innerhalb der folgenden 16 Tage wurde keine Veränderung des Antikörpergehaltes festgestellt.

Am Versuchsende, nach weiteren 26 Tagen, war der Titer um zwei Stufen auf 1:20 abgesunken.

Versuchsgruppe 8

Immunisierung:

10-malige Injektion von 1,0 ml Antigen mit je 1,0 ml FA intramuskulär,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen in 2,0 ml FA intramuskulär.

Immunantwort:

Die ersten Untersuchungen zeigten ein allmähliches Ansteigen des Titers (10. Versuchstag Titer 1:10; 21. Versuchstag Titer 1:25). In den folgenden 17 Tagen konnte eine

starke Antikörperzunahme festgestellt werden (38. Tag Titer 1:160). Nachdem sich in den nächsten 14 Tagen keine Veränderung des Antikörpergehaltes zeigte, ergaben die Untersuchungen vom 60. Tag an einen starken Titeranstieg, wobei am 102. Tag das Maximum mit einem Titer von 1:500 erreicht war. Von diesem Zeitpunkt an bis zum 189. Tag wurde ein etwa gleichmäßiger Titerabfall gemessen, der Titer lag jedoch am 189. Tag noch bei 1:80.

Die Boosterinjektion am 189. Tag bewirkte einen erneuten Titeranstieg. Der maximale Antikörpergehalt wurde 21 Tage nach dieser Injektion am 210. Versuchstag mit einem Titer von 1:600 gemessen. Die acht Tage darauf, am 218. Tag durchgeführte Untersuchung zeigte eine Verminderung des Antikörpergehaltes um nicht ganz eine Titerstufe.

Am Versuchsende (244. Tag) wurde wie am 218. Tag noch ein Titer von 1:320 ermittelt.

Versuchsgruppe 9

Immunisierung:

10-malige Injektion von 2,0 ml Antigen intraperitoneal, Boosterung mit 2,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Am 10. Tag nach der Erstimmunisierung zeigte sich ein Titer von 1:8. Nach einem langsamen Titeranstieg bis zum 26. Tag (Titer 1:50) wurde nach weiteren 5 Tagen am 31. Tag bereits ein Titer von 1:200 gemessen. Ein weiterer Titeranstieg zeigte sich am 38. Tag mit einem Titer von 1:320. Nach einem Absinken des Titers vom 46. Tag (Titer 1:320) bis zum 75. Tag (Titer 1:200) kommt es nach der letzten Injektion, die am 77. Tag verabreicht wurde, zu einem erneuten starken Titeranstieg. Bereits am 88. Tag wird ein Titer von 1:480 ermittelt. Das Titermaximum von 1:640 ist am 94. Tag erreicht. Nachdem der Titer am 108. Tag auf 1:220 abgesunken war, ergibt sich bis zum 129.

Tag keine Veränderung des Titers. In den darauffolgenden 20 Tagen sank der Titer gleichmäßig ab, bis am 150. Tag ein Titerwert von 1:50 gemessen wurde. Geringgradig niedrigere Titer von 1:40 ergaben die Untersuchungen, die bis zum 189. Tag durchgeführt wurden.

Nach der Boosterung am 189. Tag zeigte sich eine Zunahme des Antikörpergehaltes, wobei 21 Tage nach dieser Injektion ein Titer von 1:320 ermittelt wurde. Bis zum Versuchsende (244. Tag) sank der Titer um eine Stufe auf 1:160.

4.2. Versuchsreihe II

Versuchsgruppe 1

Immunisierung:

3-malige Injektion von 1,0 ml Antigen subkutan,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Erstmalig ergab die Auswertung der am 9. Versuchstag gewonnenen Seren einen Titer von 1:40. Die folgenden Untersuchungen zeigten einen Titerabfall (14. und 17. Tag Titer 1:30; 21. und 28. Tag Titer 1:20). Nach leichten Titterschwankungen wurde vom 39. bis zum 64. Tag ein konstanter Titer von 1:30 ermittelt. In der Folgezeit verminderte sich der Titer kontinuierlich, so daß am 100. Tag nur noch ein geringer Antikörpergehalt mit einem Titer von 1:5 auftrat.

Ausgelöst durch die Boosterinjektion am 100. Tag konnten bereits am 106. Tag Antikörper mit einem Titer von 1:80 nachgewiesen werden. Einen anhaltenden Titeranstieg zeigte die Untersuchung am 111. Tag, an dem ein Titer von 1:120 festgestellt wurde.

Sieben Tage lang blieb der Antikörpergehalt auf dieser Höhe, bis zum 155. Tag folgte dann ein Titerabfall auf Werte von 1:60.

Versuchsgruppe 2

Immunisierung:

3-malige Injektion von 1,0 ml Antigen mit je 1,0 ml FA subkutan,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intravenös.

Immunantwort:

Die Untersuchungen zeigten einen langsamen Titeranstieg, am 9. Tag betrug der Titer 1:8, vom 14. bis zum 21. Tag 1:15. Einen stärkeren Titeranstieg ergaben die folgenden Untersuchungen: am 28. Tag betrug der Titer 1:60, am 32. Tag 1:80. Darauf folgte vom 35. bis 43. Tag ein leichter Titerabfall auf 1:60, am 46. und 50. Tag wurden jedoch wieder Werte von 1:80 festgestellt. In einem Zeitraum von 50 Tagen (50. bis 100. Tag) trat ein gleichmäßiger Titerabfall auf, der am 100. Tag seine niedrigste Stufe mit einem Titer von 1:15 erreichte.

Nach der Boosterinjektion am 100. Tag manifestierte sich die anamnestiche Reaktion in einem steilen Titeranstieg. Am 106. Tag wurde bereits ein Titer von 1:160 gemessen. Innerhalb von fünf Tagen sank der Titer auf 1:120 und blieb bis zum Versuchsende (155. Tag) auf dieser Höhe.

Versuchsgruppe 3

Immunisierung:

3-malige Injektion von 1,0 ml Antigen mit je 1,0 ml FA intramuskulär,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Früheste feststellbare Titer traten bereits am 7. Tag nach der Erstimmunisierung auf (Titer 1:15). Schon am 10. Tag zeigten Titer von 1:60 einen steilen Antikörperanstieg, der sich bis zum 28. Tag (Titer 1:120) fortsetzte. In den folgenden 29 Tagen wurde bis auf ein zwischenzeitlich leichtes Absinken ein gleichbleibender Titer von 1:120 festgestellt. Von diesem Zeitpunkt an sinkt der Antikörpergehalt langsam, am 100. Tag wird noch ein Titer von 1:40 gemessen.

Sechs Tage nach der Boosterung drückt sich eine starke Immunantwort in einem Titer von 1:240 aus. Nachdem am 118. Tag nochmals ein Titer von 1:240 auftrat, zeigten die weiteren Untersuchungen einen Titerabfall. Am Versuchsende (155. Tag) betrug der Titer 1:80.

Versuchsgruppe 4

Immunisierung:

1-malige Injektion von 1,0 ml Antigen intravenös,
2-malige Injektion von 1,0 ml Antigen mit je 1,0 ml FA
intramuskulär,
Boosterung mit 3,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Eine Immunantwort konnte erstmals am 7. Versuchstag mit einem Titer von 1:30 festgestellt werden. Schon zwei Tage später, am 9. Versuchstag, wurde ein Titer von 1:60 nachgewiesen, der bis zum 17. Versuchstag unverändert blieb. Von diesem Zeitpunkt an war ein gleichmäßiger Titerabfall zu erkennen, so daß am 74. Tag nur ein Titer von 1:5 auftrat. Komplementbindende Antikörper waren am 85. und 100. Versuchstag nicht mehr nachweisbar.

Die anamnestische Reaktion auf die Boosterung am 100. Tag zeigte sich sechs Tage später durch einen Titer von 1:40. Nach einem weiteren Anstieg innerhalb der nächsten fünf Tage auf 1:60 blieb der Titer acht Tage auf dieser Höhe. Daran schloß sich ein gleichmäßiger Titerabfall bis zum 155. Tag an, hier betrug der Titer 1:20.

Versuchsgruppe 5

Immunisierung:

3-malige Injektion von 2,0 ml Antigen intraperitoneal, Boosterung mit 4,0 ml Antigen intraperitoneal.

Immunantwort:

Vier Tage nach der Erstimmunisierung waren Antikörper noch nicht nachweisbar. Drei Tage später zeigte sich mit einem Titer von 1:80 ein steiler Antikörperanstieg. Die weiteren Untersuchungen ergaben nochmals einen Titeranstieg, der sein Maximum schon am 14. Versuchstag mit einem Titer von 1:320 zeigte. Innerhalb der nächsten vierzehn Tage sank der Titer um zwei Stufen auf 1:80 und blieb elf Tage lang auf dieser Höhe. Von diesem Zeitpunkt an (39. Tag) war ein kontinuierliches Absinken des Titers zu verzeichnen, so daß am 100. Tag komplementbindende Antikörper nicht mehr nachweisbar waren.

Sechs Tage nach der Boosterung war der Titer auf 1:40 angestiegen, sank jedoch nach fünf Tagen auf 1:30, bis zum Versuchsende (155. Tag) auf 1:20.

Versuchsgruppe 6

Immunisierung:

2-malige Injektion von 0,5 ml Antigen mit 0,5 ml FA intrasolear,
Boosterung mit 2,0 ml Antigen intravenös.

Immunantwort:

Sieben Tage nach der Erstimmunisierung war ein Titer von 1:20 nachweisbar. Bereits am neunten Tag zeigte sich ein Titer von 1:80, am 14. Tag ein Titer von 1:160. Von diesem Zeitpunkt an verringerte sich der Antikörpergehalt etwa gleichmäßig bis zum 100. Tag, an dem komplementbindende Antikörper nicht mehr nachweisbar waren.

Ein erneuter Titeranstieg auf 1:60 war sechs Tage nach der Boosterung feststellbar. Schon fünf Tage später war der Titer auf 1:30 abgesunken. Er blieb bis zum Versuchsende (155. Tag) auf dieser Höhe.

4.3. Untersuchung des IgG- und IgM-Anteils der Kaninchenserum der Versuchsreihe II im Verlauf der Immunantwort

Bei der vergleichenden Auswertung der KBR, die mit unbehandelten und mit 2-MÄ behandelten Seren durchgeführt wurde, zeigen sich folgende Ergebnisse:

Die Titer der mit 2-MÄ behandelten Seren liegen, wie in Tabelle 4 dargestellt ist, während der ersten 21 Tage nach der Erstimmunisierung gegenüber denen der unbehandelten Seren etwa um 3 Titerstufen niedriger.

Vom 21. bis zum 43. Tag nach der letzten Immunisierung beträgt der Titerunterschied etwa 2 Stufen, von diesem Zeitpunkt bis zum 50. Tag noch etwa 1 Stufe.

Bis zum Versuchsende, auch nach der anamnестischen Reaktion (Boostereffekt, Titeranstieg) wurden weitgehend nur wenig niedrigere Titer in der KBR mit unbehandelten und mit 2-MÄ behandelten Seren erhalten.

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich kaum Abweichungen, die Ergebnisse sind deshalb in Abb. 5 am Beispiel des Titerverlaufs der Versuchsgruppe 3 dargestellt.

Tab. 3: Durchschnittlicher Titer in Gruppe 1-9 der Versuchsreihe I im Verlauf der Immunisierung

Tag nach der Erstimmunisierung	Versuchsgruppe								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	5 ⁺	-	-	-	5	-	10	-	-
10	60	30	15	10	15	7	20	10	8
13	40	20	15	30	30	10	25	17	15
17	40	20	30	40	27	10	25	20	40
21	40	30	60	75	50	20	40	25	40
26	40	30	120	80	50	25	80	55	50
31	40	40	80	100	80	40	60	110	200
38	40	40	120	160	100	55	80	160	320
46	40	20	60	160	150	55	40	160	320
52	40	20	60	100	80	40	40	160	240
60	40	20	40	160	130	40	50	280	160
68	40	20	80	240	130	40	50	280	160
75	40	40	80	80	75	60	50	200	200
88	40	40	60	240	110	80	120	240	480
94	40	40	60	240	280	115	80	480	640
102	40	40	160	480	200	160	120	500	620
108	20	20	80	160	140	120	50	320	220
114	20	20	60	160	140	80	50	240	220
122	20	10	40	160	140	50	30	320	220
129	20	10	40	160	140	50	30	320	220
137	20	10	40	160	140	40	20	320	160
143	15	5	30	80	55	30	15	200	80
150	5	2,5	15	60	40	30	10	160	50
178	5	-	10	35	15	8	7	80	40
189	2,5	-	5	25	15	5	-	80	40
195	80	80	160	100	120	50	40	200	120
202	120	80	80	160	240	80	80	280	240
210	80	60	80	280	240	80	80	600	320
218	40	40	80	170	200	120	80	320	240
244	30	15	20	170	80	60	20	320	160

⁺ reziproker Titerwert

Tab. 4: Durchschnittlicher Titer in Gruppe 1-6 der Versuchsreihe II im Verlauf der Immunisierung

A: Gesamtantikörper

B: 2-M $\bar{A}$ resistente Antikörper

Tag nach der Erstimmunisierung	Versuchsgruppe											
	1		2		3		4		5		6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	15	-	30	5	80	5	20	5
9	40 ⁺	5	8	-	60	10	60	10	160	25	80	20
14	30	5	15	5	60	10	60	15	320	40	160	20
17	30	5	15	5	80	15	60	15	160	30	120	30
21	20	5	15	10	60	15	20	10	160	40	80	20
28	20	10	60	40	120	30	30	10	80	30	120	20
32	40	15	80	35	120	25	30	10	80	30	40	20
35	20	10	60	40	120	40	20	15	80	40	40	20
39	30	10	60	40	120	60	15	10	80	60	30	20
43	30	20	60	55	80	55	15	10	40	30	20	15
46	30	20	80	50	80	50	15	5	40	25	20	20
50	30	20	80	60	80	70	15	10	30	20	15	10

- 50 -

Fortsetzung d. Tab. 4 v. S. 50

Tag nach der Erstimmunisi- erung	1		2		Versuchsgruppe				4		5		6	
	A		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
					3									
57	30	30	60	55	120	70	8	5	10	10	10	10	10	5
64	30	25	40	30	100	70	8	5	10	8	8	8	8	-
74	15	10	40	35	60	50	5	5	5	-	5	5	5	5
85	10	5	20	20	40	30	-	-	5	5	5	5	5	5
100	5	5	15	10	40	35	-	-	-	-	-	-	-	-
106	80	60	160	140	240	160	40	30	40	30	40	30	60	50
111	120	100	120	110	160	130	60	50	30	20	30	20	30	25
118	120	110	120	90	240	140	60	40	30	30	30	30	30	20
127	80	60	120	100	160	120	40	30	30	25	30	25	30	30
155	60	50	120	110	80	70	20	15	20	15	20	15	30	25

+ reziproker Titerwert

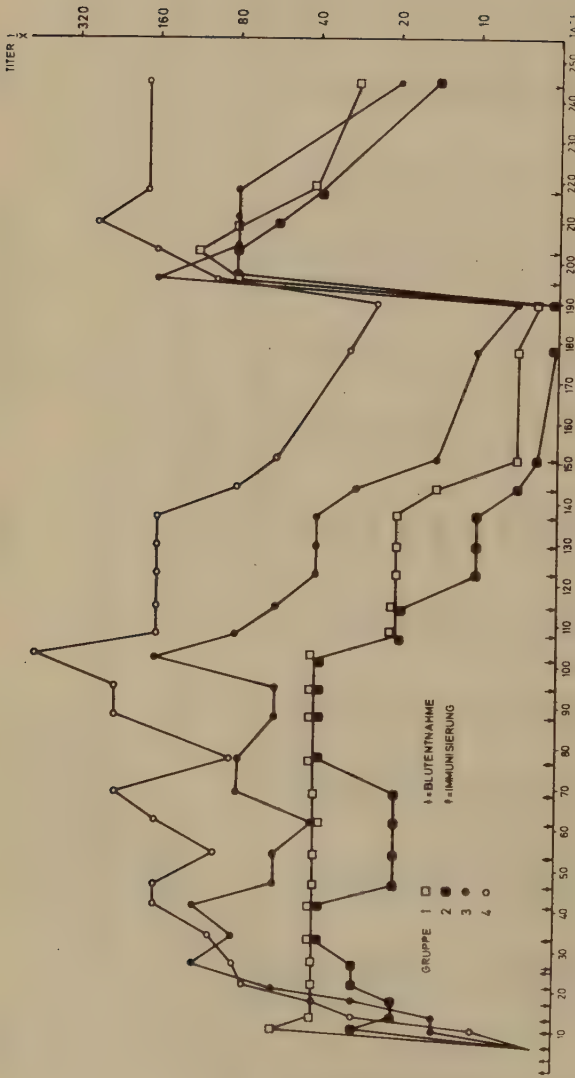


Abb. 1: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen mit *C. burnetii*.
(Stämme "Nine Mile" und "Henzerling") Versuchsreihe I, Gruppe 1-4

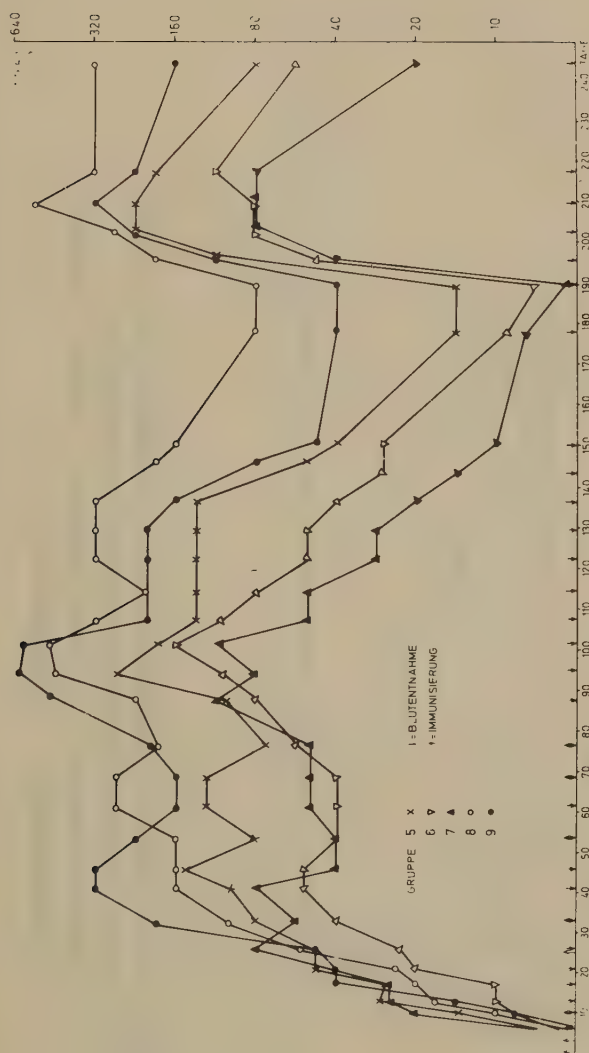


Abb. 2: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen mit C. burnetii.
(Stämme "Nine Mile" und "Henzerling") Versuchsreihe I, Gruppe 5-9

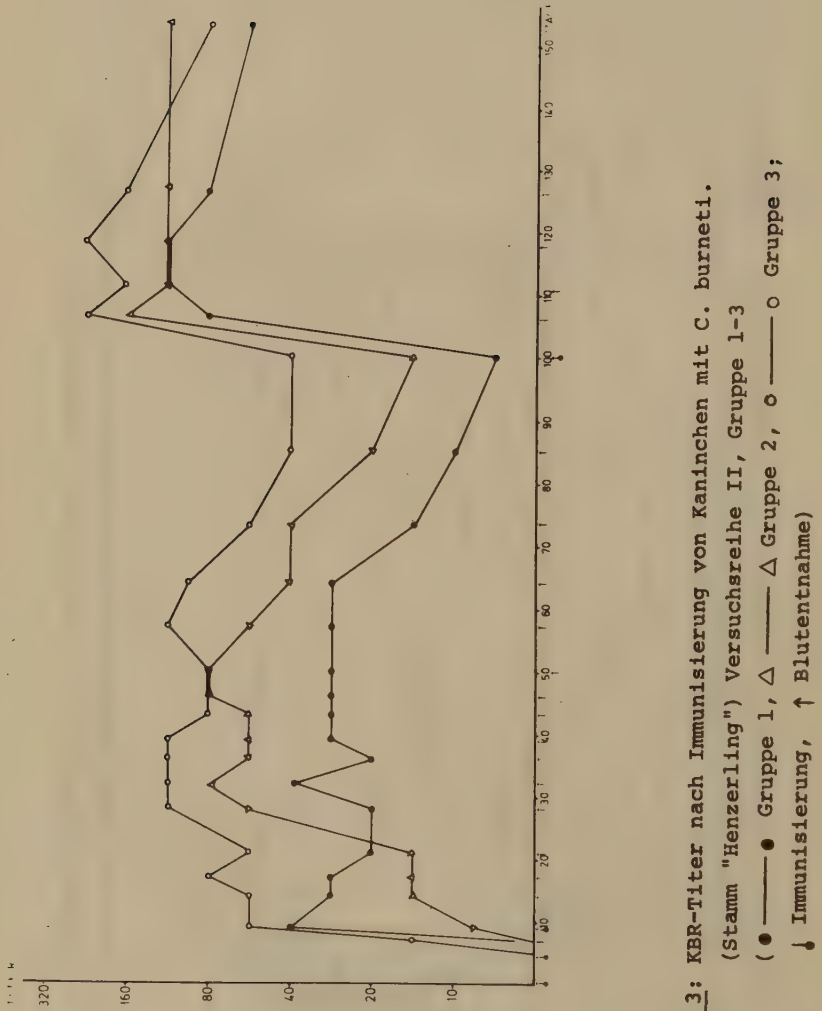


Abb. 3: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen mit C. burneti.
(Stamm "Henzerling") Versuchsreihe II, Gruppe 1-3
(● — Gruppe 1, △ — Gruppe 2, ○ — Gruppe 3;
↑ Immunisierung, ↑ Blutentnahme)

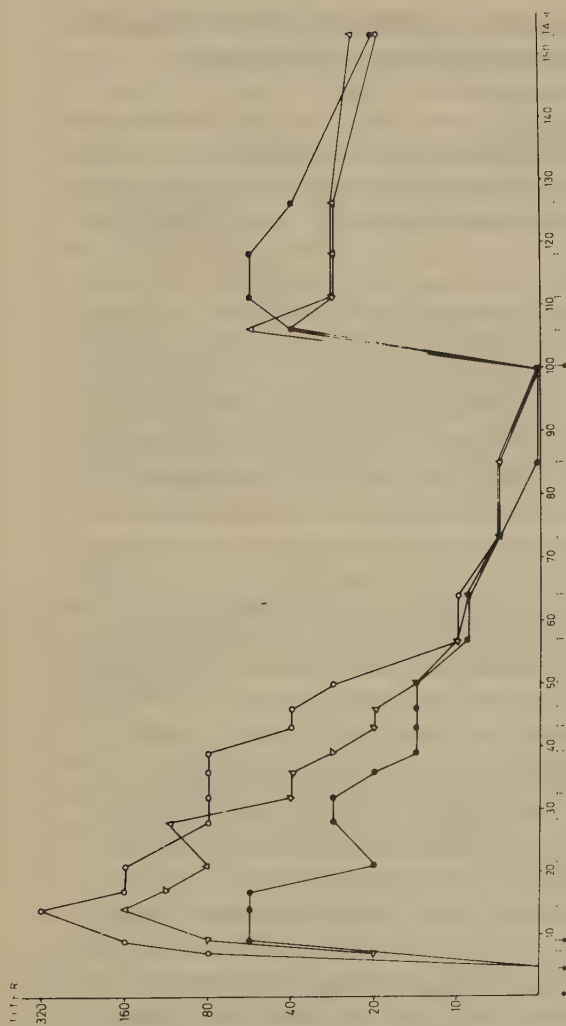


Abb. 4: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen mit C. burneti.
(Stamm "Henzerling") Versuchsreihe II, Gruppe 4-6
(● — Gruppe 4, ○ — Gruppe 5, △ — Gruppe 6;
↓ Immunisierung, ↑ Blutentnahme)

5. Besprechung der Ergebnisse

5.1. Welchen Einfluß hat die Anzahl der Injektionen auf die Bildung komplementbindender Antikörper?

- a) Subkutane Immunisierung mit je 1,0 ml Antigen homogenisiert in 1,0 ml komplettem Freund'schen Adjuvans. Vergleichbar sind Versuchsgruppe 2 (II) mit 3-maliger Immunisierung und Versuchsgruppe 4 (I) mit 10-maliger Immunisierung.

Bei beiden Gruppen zeigt sich mit dem Titer 1:10 am 10. Versuchstag ein langsamer Titeranstieg. Während bei der Gruppe, die am 9. Versuchstag die 3. und zunächst letzte Injektion erhalten hatte, der Titer nur langsam ansteigt (14. bis 21. Tag Titer 1:15), bewirkt die weitere Immunisierung der Tiere der Vergleichsgruppe bis zum 21. Tag einen weit höheren Antikörpergehalt, der sich in einem Titer von 1:75 zeigt.

Ein vergleichbar hoher Titer von 1:80 wird bei den nur 3-mal immunisierten Tieren erst am 32. Versuchstag erreicht. Die Tiere dieser Gruppe zeigen 20 Tage lang einen etwa gleichbleibenden Titer, jedoch keinen weiteren Titeranstieg.

Im Gegensatz dazu läßt sich bei den Tieren, die weitere Injektionen erhielten sechs Tage nach der am 32. Tag verabreichten 7. Injektion ein Titer von 1:160 feststellen, fünfzehn Tage nach der am 53. Tag gegebenen 8. Injektion ein Titer von 1:240. Nach Absinken des Titers auf 1:80 ergibt sich elf Tage nach der 10. Injektion ein erneuter Titeranstieg auf 1:240, nach weiteren 14 Tagen am 102. Tag ein Titer von 1:480. Auf diesen Antikörper-Peak folgt innerhalb von sechs Tagen ein Titerabfall auf 1:160. Nachdem der Titer 30 Tage lang unverändert blieb (Plateaubildung), kommt es vom 137. Tag, das sind 60 Tage nach der letzten

Immunisierung, bis zum 189. Tag zu einem stetigen Titerabfall (Titerendpunkt 1:25).

Bei den nur 3-mal immunisierten Tieren der Vergleichsgruppe 2 beginnt der Titerabfall bereits am 50. Tag, d.h. 41 Tage nach der letzten Immunisierung.

Die Geschwindigkeit der Antikörperabnahme ist bei beiden Gruppen deutlich unterschiedlich. Gemessen vom Zeitpunkt des Maximaltiters sinkt der Titer bei den 3-mal immunisierten Tieren innerhalb fünfzig Tagen auf 1:15, während die 10-mal immunisierten Tiere noch 87 Tage nach dem Titermaximum noch einen Wert von 1:25 zeigen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch 10-mal wiederholte subkutane Immunisierung der Antikörpergehalt stärker als bei nur 3-maliger Immunisierung steigt und ein frühzeitiges Absinken des Titers verhindert wird.

- b) Intramuskuläre Immunisierung mit je 1,0 ml Antigen homogenisiert in 1,0 ml komplettem Freund'schen Adjuvans. Vergleichbar sind Versuchsgruppe 3 (II) mit 3-maliger Immunisierung und Versuchsgruppe 8 (I) mit 10-maliger Immunisierung.

Wie auch bei subkutaner Immunisierung läßt sich durch 10-mal intramuskulär gespritztes Antigen mit FA die Bildung humoraler Antikörper gegenüber einer gleichen aber nur 3-mal durchgeführten Injektion steigern:

3-malige Immunisierung: maximaler Titer 1:120

10-malige Immunisierung: maximaler Titer 1:500

- c) Intraperitoneale Immunisierung mit je 2,0 ml Antigen. Vergleichbar sind Versuchsgruppe 5 (II) mit 3-maliger Immunisierung und Versuchsgruppe 9 (I) mit 10-maliger Immunisierung.

Bei den Tieren der Versuchsgruppe 5 (3-malige Immunisierung) wird nach Versuchsbeginn ein schnell ansteigender Titer registriert, er beträgt am 7. Versuchstag 1:80,

am 14. Versuchstag bereits 1:320. Von diesem Zeitpunkt an sinkt der Titer in sechzig Tagen etwa gleichmäßig auf 1:5.

Dagegen ist aus den Ergebnissen der in Gruppe 9 immunisierten Tiere ein langsamerer Antikörperanstieg zu ersehen. Ein Titer von 1:320 wird erst am 38. Versuchstag erreicht. Trotz einer erneuten Immunisierung am 53. Tag kann der Antikörpergehalt nicht weiter gesteigert werden, es kommt vielmehr zu einem Titerabfall um eine Stufe. Erst die 9. und 10. Injektion am 68. bzw. 77. Tag bewirken innerhalb von zwanzig Tagen einen Titeranstieg um zwei Stufen auf 1:640.

Während bei den 3-mal immunisierten Tieren der Titer in 60 Tagen um 6 Stufen von 1:320 auf 1:5 absinkt, wird nach 10-maliger Immunisierung ein langsamerer Titerabfall beobachtet. Hier sinkt der Titer in 84 Tagen nur um 4 Titerstufen von 1:640 auf 1:40.

5.2. Welchen Einfluß hat die Dosis des Antigens auf die Antikörperbildung?

Zur Beantwortung dieser Frage werden die Ergebnisse

- a) der Gruppen 2 und 7 der Versuchsreihe I
- b) der Gruppen 3 und 9 der Versuchsreihe I

jeweils miteinander verglichen.

- a) In Gruppe 2 erfolgte die intravenöse Immunisierung mit Antigensuspension in aufsteigender Dosierung (0,5 - 3 ml), in Gruppe 7 erfolgte die intravenöse Immunisierung mit Antigensuspension in gleichbleibender Dosierung (1,0 ml). Der Titerverlauf beider Gruppen ist in Abb. 6 dargestellt.

Nach etwa gleichmäßigem Titeranstieg in beiden Gruppen während der ersten 17 Versuchstage zeigt sich, daß bei aufsteigender Antigendosierung die Immunantwort nur

langsam eintritt, sechs Tage nach der 6. Injektion von 3,0 ml Antigen beträgt der Titer am 31. Versuchstag nur 1:40. Dagegen wird bei gleichbleibender Dosierung nach der 5. Injektion ein Titer von 1:80 erreicht.

Weitere hohe Dosen Antigen, die die Tiere der Gruppe 2 erhielten, bewirken keine Steigerung der Antikörperbildung. Demgegenüber wird bei Immunisierung mit gleichbleibender Antigendosis nochmals eine Zunahme des Antikörpergehaltes festgestellt. Bei diesen Tieren wird am 88. Versuchstag, 11 Tage nach der 10. Injektion, ein Titer von 1:120 ermittelt, während die Vergleichsgruppe 2 zu diesem Zeitpunkt nur einen Titer von 1:40 aufweist.

177 Tage nach Versuchsbeginn sind bei den Tieren, die mit aufsteigenden Antigendosen immunisiert wurden, komplementbindende Antikörper nicht mehr nachweisbar. Zum selben Zeitpunkt treten in der Vergleichsgruppe noch Antikörper mit einem Titer von 1:7 auf.

Die intravenöse Applikation aufsteigender Antigendosierungen bewirkt eine schwächere und nicht so lang anhaltende Immunantwort, wie die in gleicher Folge intravenös gegebene gleichbleibende Antigendosis von 1,0 ml.

- b) In Gruppe 3 erfolgte die 10-malige intraperitoneale Injektion von je 1,0 ml Antigen, in Gruppe 9 die 10-malige intraperitoneale Injektion von je 2,0 ml Antigen. Der Titerverlauf beider Gruppen ist in Abb. 7 dargestellt.

Die Immunisierung mit je 1,0 ml Antigen bewirkt zunächst bis zum 26. Versuchstag eine stärkere Immunantwort (Titer 1:120), als dies durch die Injektion von je 2,0 ml Antigen erreicht wird (Titer 1:50). Im weiteren Verlauf der Immunantwort ergibt die Immunisierung mit je 2,0 ml Antigen gegenüber der Ver-

gleichsgruppe einen steileren Antikörperanstieg. So wird in Versuchsgruppe 9 bereits am 38. Tag ein Titer von 1:320 gemessen, am 94. Versuchstag, das sind 17 Tage nach der letzten Immunisierung, ein Titer von 1:640. Eine weit schwächere Immunantwort wird bei Immunisierung von je 1,0 ml Antigen im gleichen Zeitabschnitt ausgelöst, da bei den Tieren der Gruppe 3 der Titer 1:120 nicht übersteigt.

112 Tage nach der 10. und letzten Immunisierung ist bei Gruppe 9 (2,0 ml i.p.) ein Titer von 1:40, bei Gruppe 3 (1,0 ml i.p.) von 1:5 nachweisbar.

Der Vergleich zeigt, daß sich bei intraperitonealer Injektion des Antigens mit je 2,0 ml im Gegensatz zur Immunisierung mit je 1,0 ml eine stärkere Immunantwort und außerdem ein langsamerer Rückgang des Antikörpergehaltes ergibt.

5.3. Welchen Einfluß hat die unterschiedliche Applikationsform auf die Bildung komplementbindender Antikörper?

Zur Beantwortung dieser Frage werden die Ergebnisse folgender Versuchsgruppen der Versuchsreihe I miteinander verglichen:

<u>Intraperitoneale</u>	Immunisierung	Gruppe 3
<u>Subkutane</u>	Immunisierung	Gruppe 6
<u>Intravenöse</u>	Immunisierung	Gruppe 7

In allen drei Gruppen wurden die Tiere 10-mal mit je 1,0 ml Antigensuspension immunisiert. Der Titerverlauf dieser drei Gruppen ist in Abb. 8 dargestellt.

Drei Tage nach Erstimmunisierung sind bei keiner der Gruppen Antikörper nachweisbar. Erstmals treten Antikörper bei den intravenös immunisierten Tieren am 6. Tag mit einem Titer von 1:10 auf. Vom 17. Tag an zeigen jedoch die intra-

peritoneal immunisierten Tiere den steilsten Antikörperanstieg. Während bei diesen am 21. Versuchstag bereits ein Titer von 1:60 auftritt, liegt er am gleichen Tag nach intravenöser Immunisierung bei 1:40, bei subkutaner Immunisierung bei 1:20. Nach weiteren fünf Tagen steigen die Titer der intravenös und intraperitoneal immunisierten Tiere weiter auf 1:120 (i.p.) bzw. 1:80 (i.v.) an.

Der Titeranstieg in der subkutan immunisierten Gruppe erfolgt später und erreicht um den 45. Tag als Maximum 1:55.

Schließlich liegen die Titer aller drei Gruppen um den 45. Tag zwischen 1:40 und 1:60.

Im weiteren Untersuchungszeitraum ist bei allen drei Gruppen ein Titeranstieg zu erkennen, wobei die intraperitoneal und intravenös immunisierten Tiere Titer-schwankungen von einer halben Stufe aufweisen, während bei den subkutan immunisierten Tieren ein gleichmäßiger Titeranstieg festzustellen ist.

Gleiche Titerwerte von 1:160 erreichen die intraperitoneal und subkutan immunisierten Tiere am 100. Versuchstag, das sind 23 Tage nach der 10. Immunisierung. Zum gleichen Zeitpunkt ergibt die Untersuchung der intravenös immunisierten Tiere einen Titer von 1:120.

Von diesem Zeitpunkt an (100. Versuchstag) beginnen die Titer aller drei Gruppen abzufallen. Dabei zeigen die intravenös immunisierten Tiere einen etwas schnelleren Titerabfall als die Vergleichsgruppen. Am 189. Tag sind hier Antikörper nicht mehr nachweisbar, zum selben Zeitpunkt liegt der Titer beider Vergleichsgruppen noch bei 1:5.

Zusammenfassend ergibt sich, daß nach intravenöser Immunisierung am frühesten Antikörper nachweisbar sind. Den steilsten Antikörperanstieg in den ersten drei bis vier Wochen p. Vacc. zeigt jedoch die intraperitoneal immunisierte Versuchsgruppe. Die höchsten Titer werden nach intraperitonealer und subkutaner Applikation des Antigens

erreicht, wobei die subkutane Immunisierung den langsamsten aber auch gleichmäßigsten Titeranstieg aufweist. Etwas niedrigere Titerstufen ergibt die intravenöse Applikation, außerdem fällt der Titer bei diesen Tieren vergleichsweise schneller ab.

5.4. In welcher Weise beeinflusst die Verwendung von Freund'schem Adjuvans (FA) die Immunantwort?

Kaninchen wurden zum einen mit reinen Antigensuspensionen immunisiert, zum anderen mit Antigensuspensionen, die mit gleichen Teilen FA homogenisiert worden waren. Zum Vergleich können die Ergebnisse folgender Gruppen herangezogen werden:

- a) Versuchsgruppe 4 und 6 aus Versuchsreihe I,
- b) Versuchsgruppe 1 und 2 aus Versuchsreihe II.

a) Versuchsreihe I

Eine 10-malige subkutane Immunisierung wurde in Gruppe 6 mit 1,0 ml Antigensuspension ohne FA und in Gruppe 4 mit 1,0 ml Antigensuspension mit FA vorgenommen.

Der Titerverlauf beider Gruppen ist in Abb. 9 dargestellt.

Titer von 1:10 wurden am 10. Tag nach der ersten Vakzination bei den Tieren festgestellt, die Antigen + FA erhielten. Darauf folgte bei dieser Gruppe ein steiler Titeranstieg (Gr. 4 am 26. Tag Titer 1:80).

Demgegenüber verlief die Titerkurve der Vergleichsgruppe (Immunisierung ohne FA) flacher, hier betrug der Titer am 10. Tag 1:7, am 26. Tag 1:25. Auch in der weiteren Untersuchungszeit zeigte sich die bessere Antigenität der Adjuvans-Vakzine ebenfalls deutlich. Während am 68. und 102. Tag nach Erstimmunisie-

nung in Gruppe 6 Titer von 1:40 bzw. 1:160 erreicht wurden, lagen in Gruppe 4 zum gleichen Zeitpunkt die Titer bei 1:240 bzw. 1:480.

Im Gegensatz zu Gruppe 6 (Ag), bei der nach dem 102. Tag der Titer kontinuierlich in 87 Tagen auf 1:5 absinkt, zeigen die Ergebnisse der Gruppe 4 (Ag + FA) nach einem Titerabfall zwischen dem 101. und 108. Tag (von 1:480 auf 1:160) während der folgenden 29 Tage einen konstanten Titer von 1:160. Erst vom 137. Tag an war ein Titerabfall bis zum 189. Tag auf 1:25 zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen somit, daß der Adjuvanzzusatz eine verstärkte Antikörperbildung (höhere Titerstufen) und einen verzögerten Titerabfall bewirkte.

b) Versuchsreihe II

Eine 3-malige subkutane Immunisierung wurde in Gruppe 1 mit 1,0 ml Antigensuspension ohne FA und in Gruppe 2 mit 1,0 ml Antigensuspension mit FA durchgeführt.

Der Titerverlauf beider Gruppen ist in Abb. 10 dargestellt.

In der Anfangsphase der Immunantwort wird durch Vakzinierung mit Adjuvans nur ein langsamer Titeranstieg erreicht. Der Antikörpergehalt, der in gleicher Weise, jedoch ohne FA, immunisierten Tiere liegt in dieser ersten Phase höher.

Erst am 28. Tag (19 Tage nach der dritten Injektion) zeigt sich der Adjuvanseffekt in einem steilen Titeranstieg, der innerhalb von 11 Tagen von 1:15 auf 1:80 erfolgt. Bis zum 57. Versuchstag halten sich die Titer zwischen 1:60 und 1:80.

Im gleichen Zeitabschnitt steigt der Titer bei Vakzination mit Antigen ohne FA nicht über 1:30.

91 Tage nach der letzten Injektion ist in der Gruppe 2 (Ag + FA) noch ein Titer von 1:15, in der Vergleichs-

gruppe, die Antigen ohne FA erhielt, noch ein Titer von 1:5 vorhanden.

Aus den Befunden geht hervor, daß die Verwendung von komplettem FA auch bei 3-maliger subkutaner Immunisierung zu einem stärkeren Titeranstieg und einem verzögerten Titerabfall führt. Verglichen mit der 10-maligen Injektion werden jedoch selbst mit Hilfe von FA nur Titer erreicht, die in etwa denen entsprechen, die nach Verabreichung von reinen Antigensuspensionen auftreten.

5.5. Bei welcher Applikationsform und Dosis des Antigens führt die Boosterinjektion zu einer möglichst hohen und lang dauernden Antikörperbildung?

- a) Bei Tieren, die zum Zeitpunkt der Injektion keine oder nur eine geringe Menge (Titer 1:5) komplementbindende Antikörper aufweisen, können die Ergebnisse der Gruppen 1, 2, 3, 6 und 9 der Versuchsreihe I sowie der Gruppen 1, 4, 5 und 6 der Versuchsreihe II vergleichend ausgewertet werden. Die Boosterinjektion wurde den Tieren der Versuchsreihe I 112 Tage, denen der Versuchsreihe II 91 Tage nach der letzten Vakzination verabreicht.

In der folgenden Übersicht sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt:

Versuchsreihe I

Versuchs- gruppe	Titer zum Zeitpunkt d. Injektion	Boosterung mit	Tage n. Boosterung		
			6	13	55
1	1:5	2 ml Ag iv.	1:80	1:120	1:30
2	-	2 ml Ag iv.	1:80	1:80	1:15
3	1:5	2 ml Ag iv.	1:160	1:80	1:20
6	1:5	2 ml Ag im.	1:50	1:80	1:60
7	-	2 ml Ag sc.	1:40	1:80	1:20

Versuchsreihe II

			Tage n. Boosterung		
			6	11	55
1	1:5	2 ml Ag iv.	1:80	1:120	1:60
6	-	2 ml Ag iv.	1:60	1:30	1:30
4	-	3 ml Ag ip.	1:40	1:60	1:20
5	-	4 ml Ag ip.	1:40	1:30	1:20

Wie aus der Übersicht zu ersehen ist, treten in allen Gruppen bereits 6 Tage nach der Boosterung deutliche Immunantworten auf. Hierin zeigt sich ein typischer Gegensatz zum späteren Auftreten von Antikörpern nach Erstimmunisierung.

Der höchste Antikörperanstieg ist bei den intravenös geboosterten Tieren festzustellen. Ein vergleichsweise langsamerer Antikörperanstieg wird durch intramuskuläre, subkutane und intraperitoneale Injektion des Antigens erreicht.

Die schwächste Immunantwort zeigen die Tiere, denen die höchste Dosis Antigen (4,0 ml) gegeben wurde. Der schnellste Titerabfall ist im allgemeinen bei den intravenös immunisierten Tieren zu beobachten.

- b) Bei Tieren, die zum Zeitpunkt der Boosterung noch Titer zwischen 1:15 und 1:80 aufwiesen, können die Ergebnisse der Gruppen 4, 5, 8 und 9 der Versuchsreihe I, sowie der Gruppen 2 und 3 der Versuchsreihe II vergleichend betrachtet werden.

Die folgende Übersicht zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse:

Versuchsreihe I

Versuchsgruppe	Titer zum Zeitpunkt d. Injektion	Boosterung mit	Tage nach Boosterung			
			6	13	21	55
4	1:25	2,0 Ag + FA im.	1:100	1:160	1:280	1:170
5	1:15	2,0 Ag ip.	1:120	1:240	1:240	1:80
8	1:80	2,0 Ag + FA im.	1:200	1:280	1:600	1:320
9	1:40	2,0 Ag ip.	1:120	1:240	1:320	1:160

Versuchsreihe II

			Tage nach Boosterung			
			6	11	18	55
2	1:15	2,0 Ag iv.	1:160	1:120	1:120	1:120
3	1:40	2,0 Ag ip.	1:240	1:160	1:240	1:80

Als typischer Boostereffekt ist bereits 6 Tage nach der Antigenverabreichung bei allen Tieren eine deutliche Immunantwort zu verzeichnen.

Den steilsten Titeranstieg als Reaktion auf die Boosterung ergibt die intravenöse Injektion von 2,0 ml Antigen, der Titer steigt in 6 Tagen um mehr als drei Stufen (von 1:15 auf 1:160). Ein etwas langsamerer Titeranstieg zeigt sich nach intraperitonealer Injektion.

Den vergleichsweise langsamsten Titeranstieg während der ersten 6 Tage bewirkt die intramuskuläre Boosterung mit Antigen + Freund'schem Adjuvans.

Nach intravenöser Boosterung ist das Titermaximum bereits am sechsten Tag p. Vacc. erreicht, dagegen steigen die Titer nach intraperitonealer und intramuskulärer Injektion bis zum 21. Tag p. Vacc. weiter an. Der höchste Antikörpergehalt wird durch die intramuskuläre Boosterung mit Antigen + FA nach ca. 21 Tagen erreicht. Außerdem bewirkt der Adjuvanzzusatz offensichtlich auch ebenso wie bei der Grundimmunisierung eine relativ lange Titerkonstanz.

5.6. Bestimmung des IgG- und IgM-Anteils der Seren aus Versuchsreihe II

Um Aufschluß über die IgG- und IgM-Anteile der Seren im Verlauf der Immunantwort zu erhalten, wurde nach der von SEELIGER und EMMERLING (1970) durchgeführten Methode mit 2-Mercaptoäthanol (2-MÄ) eine Trennung der beiden Antikörperklassen durchgeführt. Durch reduzierende Agentien wie 2-MÄ werden die Disulfidbrücken des IgM-Moleküls (Molekulargewicht 900000, Sedimentationskonstante 19) gespalten. Die so entstehenden Polypeptidketten zeigen keine immunologische Wirksamkeit (HUMPHREY und WHITE 1971).

Vergleicht man den Gehalt an 2-MÄ resistenten Fraktionen der in Versuchsreihe II gewonnenen Seren, ist zwischen der Primär- und Sekundärantwort bei allen Versuchsgruppen etwa übereinstimmend ein deutlicher Unterschied feststellbar. Wie in Abb. 5 am Beispiel der Versuchsgruppe 3 dargestellt ist, liegen die Titer der 2-MÄ resistenten Serumfraktionen bis 21 Tage nach Erstimmunisierung gegenüber den unbehandelten Seren um 3 Ti-

terstufen niedriger. Vom 28. Tag an weisen die Vergleichsseren nur noch einen Titerunterschied von etwa zwei Stufen auf. Die Untersuchungen vom 43. bis zum 100. Versuchstag ergeben nur geringfügig niedrigere Titer für die mit 2-MÄ behandelten Seren. Der Gehalt an 2-MÄ resistenten Seren im Verlauf der Sekundärantwort nach der Boosterinjektion am 100. Tag ist in Abb. 5 ersichtlich. Sechs Tage nach der Boosterung liegen die Titer der 2-MÄ resistenten Serumfraktionen zwar niedriger als die der Serumesamtfraktionen, es sind jedoch nur Unterschiede von maximal einer halben Titerstufe feststellbar. Bis zum Versuchsende (155. Tag) zeigen die 2-MÄ resistenten Seren gegenüber der Serumesamtfraktion nur geringfügig niedrigere Titerwerte.

Aus diesen Ergebnissen, die mit den Untersuchungen von VORONOVA (1968) an Kaninchen nach Immunisierung mit *Rickettsia prowazeki* übereinstimmen, wird deutlich, daß 2-MÄ sensible Antikörper, die dem IgM-Anteil des Serums zugerechnet werden, hauptsächlich in der Frühphase der Immunantwort auftreten. Auch SEIGNEURIN und Mit. (1972), die Kaninchen mit hitzeinaktivierten *Coxiella burnetii* Antigen (Phase II) immunisierten, berichten über ein vermehrtes Auftreten von IgM-Antikörpern während der Primärantwort. Die gleichen Beobachtungen können auch nach Immunisierung mit anderen Antigenen, z. B. Poliomyelitisviren (SVENHAG und MANDEL 1964), Salmonellen (NOSSAL und Mit. 1964) und Mykoplasmen (BRINGUIR und Mit. 1970) gemacht werden.

Im Verlauf der Sekundärantwort meiner Versuchsreihe II waren hauptsächlich 2-MÄ resistente Antikörper (7S-Antikörper) nachweisbar. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von VORONOVA (1968) und ORMSBEE (1968), die nach Boosterung ebenfalls vorwiegend Antikörper vom IgG-Typ feststellten. In einem gewissen Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von SEIGNEURIN und Mit. (1972), die zwar bei Kaninchen nach Immunisierung mit *Coxiella burnetii* in der Mikroagglutination und indirekten Immunofluoreszenz als Sekundärantwort ausschließlich IgG, in der KBR aber gleiche Mengen von IgG und IgM nachweisen konnten.

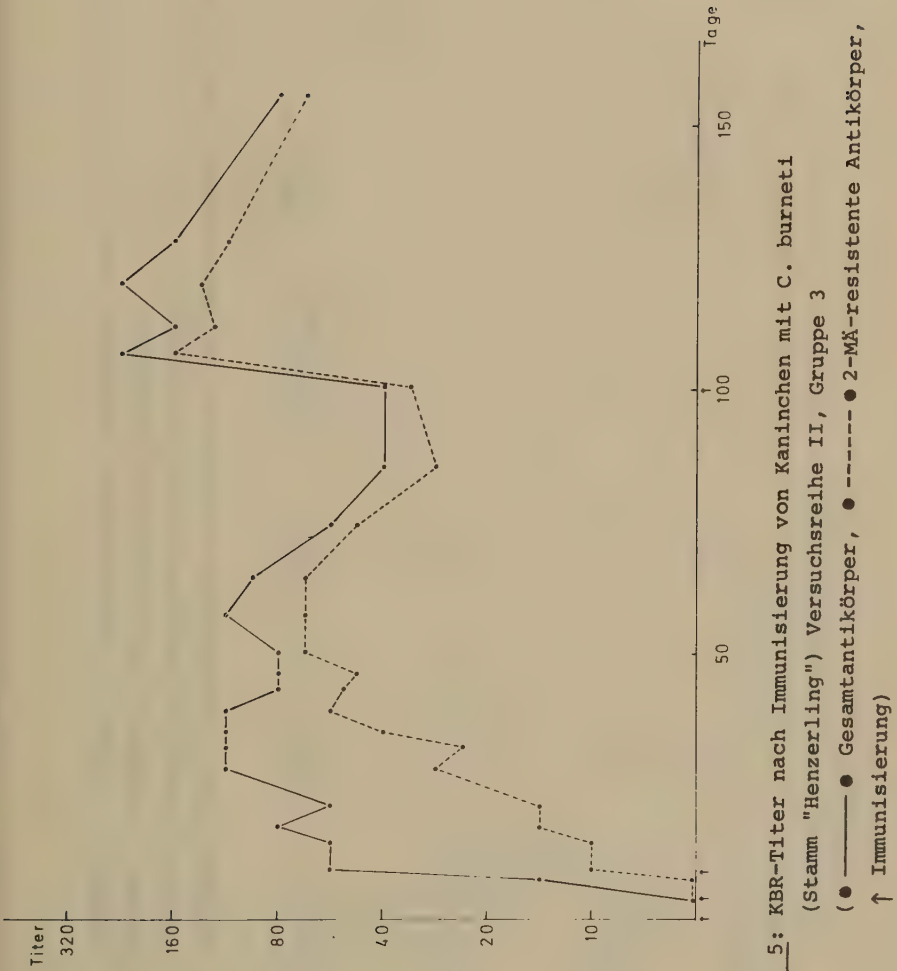


Abb. 5: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen mit C. burneti (Stamm "Henzerling") Versuchsreihe II, Gruppe 3

(● —●—● Gesamtantikörper, ● ———●—● 2-MÄ-resistente Antikörper, ↑ Immunisierung)

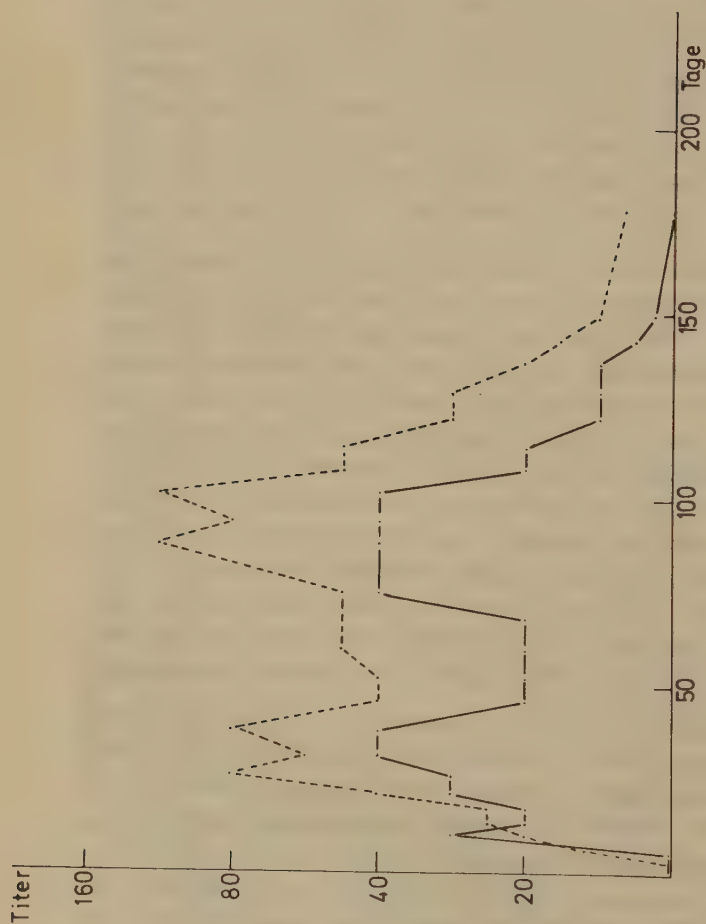


Abb. 6: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen der Versuchsreihe I mit C. burneti (Stämme "Nine Mile" und "Henzerling") (10 x i.v.)

- — Gruppe 2, Antigen in aufsteigender Dosierung 0,5 - 3,0 ml
- - - - - - Gruppe 7, Antigen in gleichbleibender Dosierung 1,0 ml

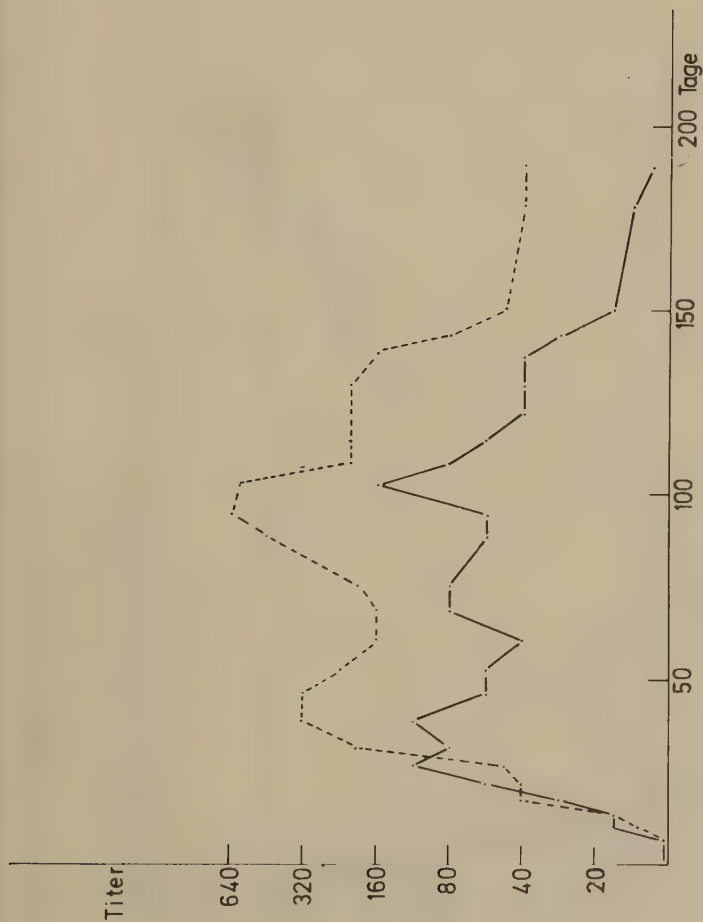


Abb. 7: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen der Versuchsreihe I mit C. burnetii (Stämme "Nine Mile" und "Henzerling") 10 x i.p.)

- — • Gruppe 3, je 1,0 ml Antigen
- - - - - - Gruppe 1, je 1,0 ml Antigen
- - . - . - - Gruppe 2, je 2,0 ml Antigen

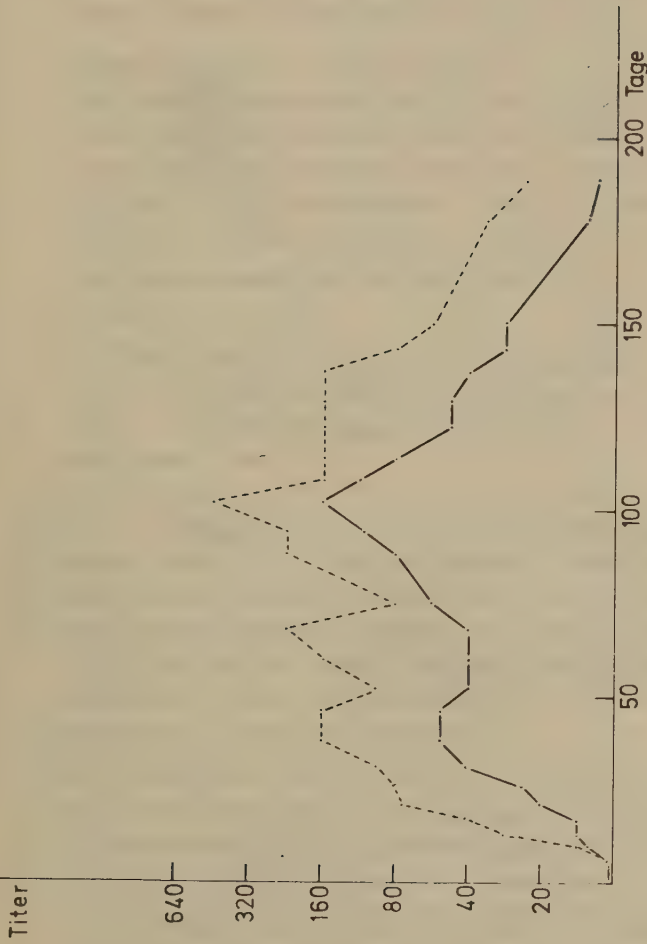


Abb. 9: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen der Versuchsreihe I mit C.burneti (Stämme "Nine Mile" und "Henzerling") (10 x s.c.)

- — • Gruppe 6, Antigen ohne FA
- - - - - - Gruppe 4, Antigen mit FA

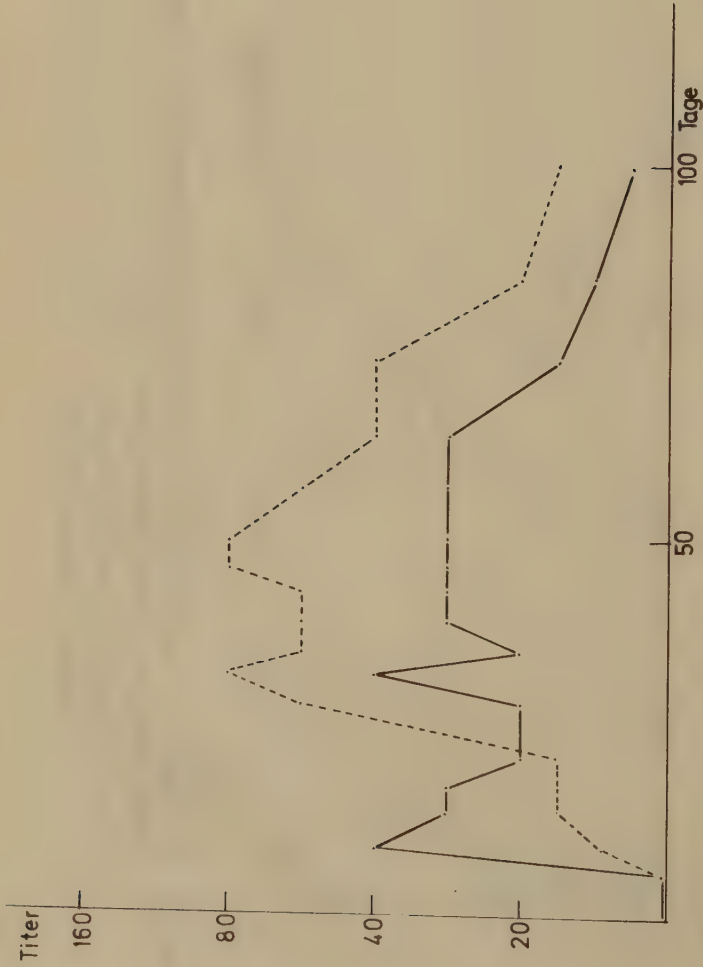


Abb. 10: KBR-Titer nach Immunisierung von Kaninchen der Versuchsreihe II mit

C. burneti (Stamm "Henzerling") 3 x s.c.)

· ——— · Gruppe 1, Antigen ohne FA

· - - - - - · Gruppe 2, Antigen mit FA

6. Zusammenfassung

1. Bei Kaninchen wurde die Immunantwort nach subkutaner, intramuskulärer, intravenöser und intrasolearer Impfung mit formolinaktivierten *Coxiella burneti* Antigenen (Phase II) vergleichend untersucht.

Die Immunisierung erfolgte zum einen mit Mischantigenen der Stämme "Nine Mile" und "Henzerling", zum anderen mit Antigen des Stammes "Henzerling". Neben reinen Antigensuspensionen wurden mit komplettem Freund'schen Adjuvans (KFA) homogenisierte Antigensuspensionen in unterschiedlicher Dosierung verwendet.

Die Untersuchung der Antiseren erfolgte in der KBR (Mikrotitermethode).

Die nach Immunisierung mit Antigen des Stammes "Henzerling" gewonnenen Seren wurden außerdem auf ihren Gehalt an 2-Mercaptoäthanolresistenten Antikörpern untersucht.

2. Nach 10-maliger Immunisierung mit Mischantigenen der Stämme "Nine Mile" und "Henzerling" traten die höchsten Titer (1:640) bei Tieren auf, die intraperitoneal mit reiner Antigensuspension geimpft wurden. Die Titer der mit Antigen und KFA immunisierten Tiere stiegen sowohl bei intramuskulärer wie auch bei subkutaner Applikation auf 1:480.

Die schwächste Immunantwort wurde nach intravenöser Injektion reiner Antigensuspensionen in aufsteigender Dosierung erhalten, hierbei stieg der Titer nicht über 1:40.

In der Regel bewirkte die Verwendung von Antigenen mit KFA gegenüber der Injektion reiner Antigensuspensionen einen langsameren Titeranstieg und einen verzögerten Titerabfall.

Nach 3-maliger Immunisierung mit Antigen des Stammes "Henzerling" wurden die höchsten Titer von 1:320 nach intraperitonealer Verabreichung reiner Antigensuspensionen ermittelt. Die intrasoleare und intramuskuläre Injektion von Antigen und KFA ergab Maximaltiter von 1:160 bzw. 1:120. Die schwächste Immunantwort (höchste Titer 1:40) zeigte sich nach subkutaner Injektion reiner Antigensuspensionen.

Im Gegensatz zur intraperitonealen Immunisierung bewirkte die Impfung mit Antigen und KFA einen langsameren Titeranstieg, aber einen verzögerten Titerabfall.

3. Die Sekundärantwort nach Boosterung zeigte in allen Versuchsgruppen im Vergleich der Primärantwort nach Erstimmunisierung einen früheren und steileren Titeranstieg. Die höchsten Titer wurden bei den Gruppen festgestellt, die zum Zeitpunkt der Boosterinjektion noch KBR-Titer zwischen 1:15 und 1:80 aufwiesen.

Die in der Primärantwort erreichten Maximaltiter wurden nach intraperitonealer und intravenöser Applikation reiner Antigensuspensionen sowie intramuskulärer Gabe von Antigen und KFA überschritten oder mindestens erreicht. Im Vergleich zur Primärantwort deutlich niedrigere Titer bewirkte die intravenöse Boosterung mit einer gegenüber den übrigen Injektionen verdoppelten Antigenmenge.

4. 2-Mercaptoäthanol resistente Antikörper (IgG) wurden im Verlauf der Primärantwort bis zum 21. Tag nur in geringer Menge gebildet. Der größte Anteil entfiel auf 2-MÄ sensible Antikörper vom IgM-Typ.

Bis etwa zum 50. Versuchstag wurde eine ständige Abnahme der IgM-Fraktion festgestellt. Von diesem Zeitpunkt an wurden auch im Verlauf der Sekundärantwort nach Boosterinjektion hauptsächlich Antikörper vom IgG-Typ nachgewiesen.

7. Literaturübersicht

1. AMOSENKOVA, N.I. Untersuchungen über experimentelle
GOLDIN, R.B. Rickettsiosen unter Verwendung
 fluoreszierender Antikörper.
Zbl. Bakt., I Abt. Ref. 195, 594, 1964
2. BABUDIERI, B. Ricerche sulla febbre Q in Italia.
Acta Med. Ital. Mal. e Parasit. 6,
1-9, 1951
3. BABUDIERI, B. L'intradermoreazione nella diagnosi
RAVAIOLI, L. della febbre Q, nella cavia.
R.C. Ist. super. Sanita 14, 532-539,
1951
4. BABUDIERI, B. Q-Fever: A Zoonosis.
Advanc. vet. Sci. 5, 81-154, 1959
5. BECHT, H. Die Bedeutung der Phasenvariation
 für den Kapillaragglutinationstest
 nach Luoto.
Zbl. Bakt. I Orig. 197, 195-201, 1965
6. BECHT, H. Zur Epizootologie, Diagnostik und
HESS, E. Bekämpfung des Q-Fiebers beim Rind.
Schweiz. Arch. Tierhk. 106, 389-399,
1964
7. BEHRINGWERKE-AG Reagenzien der Behringwerke: Ihre
 praktische Anwendung im sero-bakte-
 riologischen Laboratorium. Beiheft
 zu "Laboratoriums-Blätter"
Teil III August 1958
8. BENGSTON, I.A. Immunological relationships between
 the Rickettsiae of Australian and
 American Q-fever.
Publ. Hlth. Rep. (Wash.) 56, 272, 1941

9. BENGSTON, I.A. Complement fixation in Q-fever.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 46, 665-668, 1941
10. BERTTINA, B. Historical review of the literature
WENTWORTH on Q-fever.
Bact. Rev. 19, 129-149, 1955
11. BIELING, R. Rickettsia burnetii beim Rind.
Mh. Tierhkd. 1, 64, 1949
12. BLANC, G. Quelques données sur la Q-fever
BRUNEAU, J. expérimentale.
POITROT, R. Bull. Acad. méd. (Paris) 132, 243-
DELAGE, B. 250, 1948
13. BOCK, M. Experimentelle Untersuchungen zur
Epidemiologie des Q-Fiebers.
Z. Tropenmed. u. Parasit. 5, 348-355, 1954
14. BREED, R.S. Bergey's Manual of Determinative
MURRAY, E.G.D. Bacteriology.
SMITH, N.R. Baltimore, 1957
15. BREZINA, R. Phagocytosis of Cox. burnetii and the
KAZAR, J. Phase Variation Phenomenon.
Acta virol. 7, 476, 1963
16. BRINGUIR, J.P. Identification des classes d'immuno-
BARBE, G. globulines intervenant dans la réaction
BOSSHARD, S. de fixation du complément au cours des
SOHIER, R. infections à Mycoplasma pneumoniae.
Son intérêt diagnostique.
Bull. Ass. Dipl. Microbiol. 119, 1-13, 1970
17. BURNET, F.M. Experimental studies on the virus of
FREEMANN, M. Q-fever.
Med. J. Aust. 2, 299-305, 1937

18. BURNET, F.M. The search for immunological relationship between "Q" fever and other rickettsiosis.
FREEMAN, M.
DERRICK, E.H.
SMITH, D.J.W. Med. J. Aust. 1, 51-54, 1939
19. COMBIESCO, D. "Fievre Q" Typus pulmonaire-rickettsiose pulmonaire.
Arch. Roum. Exp. 16, 37, 1957
20. COX, H.R. Some recent advances and current problems in the field of rickettsial diseases.
Arch. Virusforsch. 4, 518-533, 1951
21. COX, H.R. Rickettsia diaporica and American Q-fever.
Amer. J. trop. Med. 20, 463, 1940
22. CRACEA, E. Study of Protective Antibodies in Q-Fever Vaccination.
Z. Immun.-Forsch. 136, 1-9, 1968
23. DAVIS, G.E.
COX, H.R. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from Dermatocentor andersoni, reactions in animals and filtration experiments.
Publ. Hlth. Rep. 53, 2259-2267, 1938
24. DENNIG, H. Über eine eigenartige Grippeepidemie auf dem Balkan.
Wien. med. Wschr. 92, 335-336, 1942
25. DERRICK, E.H. Q-fever, a new fever entity: Clinical features, diagnosis and laboratory investigation.
Med. J. Aust. 2, 281-299, 1937
26. DERRICK, E.H. Rickettsia burneti: The cause of Q-fever.
Med. J. Aust. 1, 14, 1939

27. DERRICK, E.H. The Epidemiology of Q-Fever. A Review
Aust. med. J. 1, 245-253, 1953
28. DERRICK, E.H. Studies in the epidemiologie of Q-fever.
SMITH, D.J.W. 2. The isolation of three strains of
Rickettsia burneti from the bandicoot
Isoodon torosus.
Austral. J. Exp. Biol. med. Sci. 18,
99-102, 1940
29. EMMERLING, P. Zur Antigen-sparenden Funktion immuno-
FINGER, H. logischer Adjuvantien.
OTTENHAMMER, A. Z. Immun.-Forsch. 139, 290-300, 1969
30. FEJA, E. Über das Vorkommen von Q-Fieber
Antikörpern in Menschenblutseren.
Tierärztl. Umsch. 25, 429-430, 1970
31. FISET, P. Phase variation of Rickettsia burneti
Study of the antibody response in
guinea pigs and rabbits.
Canad. J. Microbiol. 3, 435-445, 1957
32. FISET, P. The Antibody Response to Antigens of
ORMSBEE, R.A. Coxiella burneti.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 206, 321-329,
1968
33. FOX, J.P. Antikörper-Bildung gegen Rickettsien
mit Vaccine in Ölphase.
Amer. J. Hyg. 49/50, 303, 1949
34. GEIGY, R. Ein Zeckentest zum Diagnostizieren
des Q-Fiebers.
Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 7,
1-8, 1951
35. GIMENEZ, D.F. Gram staining of Coxiella burnetii.
J. Bact. 90, 834-835, 1965

44. HERZBERG, K. Weitere Befunde zur Morphologie und
HERZBERG-KREMMER, H. Diagnostik des Q-Fieber-Erregers.
URBACH, H. IV. Mitteilung
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 156, 14-22,
1950
45. HUMPHREY, J.H. Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
WHITE, R.G. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
46. IMHÄUSER, K. Untersuchungen über den Erreger der
"Viruspneumonie".
Klin. Wschr. 26, 337-339, 1948
47. KILCHSPERGER, G. Abortusepidemie bei Ziegen, bedingt
WIESMANN, E. durch Rickettsia burnetii.
Schweiz. Arch. Tierhkd. 91, 553-556,
1949
48. KIRBERGER, E. Die Resistenz der Cox. burnetii in
vitro.
Z. Tropenmed. Parasit. 3, 77-86, 1951
49. KOLMER, I.A. Approved Laboratory Technic D.
BOERNER, F. Appleton-Century Co. Inc. 3. Auflage
1941
50. KORDOVA, N. Study of antigenicity and immuno-
genicity of filterable particles of
Coxiella burnetii.
Acta virol. 4, 56-62, 1960
51. KUDELINA, R.I. Eine lösliche Fraktion von R. burnetii,
ihre Gewinnung und ihre Antigeneigen-
schaften.
Zurnal mikrobiologii, epidemiologii
i immunobiologii 5, 9-13, 1969
Übersetzung Bundessprachenamt 296/71

52. KUDELINA, R.I.
FEDOROVA, N.J. Immunogenicity of Various Phases of
Rickettsia Burneti.
J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.
44, 17-21, 1967
53. LINDE, K. Über die Herstellung und Brauchbarkeit
wässriger Kochextrakte aus mit Rinder-
albumin gereinigten Dottersackverrei-
bungen der Rickettsia burneti in der
KBR.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 184, 376-379,
1962
54. LINSS, W.
STELZNER, A.
URBACH, H. Elektronenmikroskopische Untersuchungen
über die Entwicklung von Coxiella bur-
neti im Hodengewebe des Meerschwein-
chens.
Arch. ges. Virusforsch. 26, 86-96, 1969
55. LIPPELT, H.
CASELITZ, F.H. Zur Komplementbindung des Q-Fiebers.
Dtsch. Med. Wschr. 74, 918, 1949
56. LUDWIG, Ch. "Das Q-Fieber"
in Röhrer, H.: Handbuch der Virus-
infektionen.
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1968
57. LUOTO, L. A capillary agglutination test for
bovine Q-fever.
J. Immunol. 71, 226-231, 1952
58. LUOTO, L.
WINN, J.F.
HUEBNER, R.J. Q-fever studies in Southern California.
XIII. Vaccination of dairy cattle
against Q-fever.
Amer. J. Hyg. 55, 190, 1952
59. LUOTO, L. A capillary-tube test for antibody
against Coxiella burneti in human,
guinea pig and sheep sera.
J. Immunol. 77, 294-298, 1956

60. MAY, H.-J. Serologische Untersuchungen gesunder Rinder aus Nordwestdeutschland auf Q-Fieber.
Vet.Med. Diss., Hannover 1962
61. MEIKLEJOHN, G. Q-Fever in California. I. Observations of Vaccination of human beings.
LENETTE, S.H. Amer. J. Hyg. 52, 54-64, 1950
62. MOOSER, H. "Die Rickettsiosen"
in Grumbach, Kikuth: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. 2. Aufl., Bd. I
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969
63. NAUCK, E.G. Der Erreger der epidemischen Bronchopneumonie des Menschen und seine Beziehung zu R. burnetii.
WEYER, F. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 128, 529-550, 1948 ,
64. NOSSAL, G.J.V. Antigens in immunity II Immunogenic properties of flagella, polymerized flagellin and flagellin in the primary response.
ADA, G.L. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 42,
AUSTIN, C.M. 283-294, 1964
65. ORMSBEE, R.A. Soluble Antigen and antibiotic resistance as factors in the classification of Coxiella burnetii.
Atti 6. Congr. Int.Microbiol. Roma 4, 15-20, 1953
66. ORMSBEE, R.A. An analysis of the immune response to rickettsial antigens in the guinea pig.
PEACOCK, M. Acta virol. (Eng. ed.) 12, 78-82, 1968
TALLENT, J.
MUNOZ, J.

67. PARKER, R.R. Q-fever-A brief survey of the problem.
STOENNER, H.G. J. Amer. vet.med. Ass. 114, 55-60, 1949
68. PAUTOV, V.N. On long storage of R. burneti Cultures.
POLOZOV, A.J. Vopr. virusol. 6, 213-217, 1961
69. PHILIP, C.B. Nomenclature of the pathogenic rickettsiae.
Amer. J. Hyg. 37, 301, 1943
70. PHILIP, C.B. Observations on experimental Q-fever.
I. Parasitol. 34, 457-464, 1948
71. PINTO, M.R. Ogênero "Coxiella". Estudos de algumas
estirpes de "C. burneti" isoladas em
Portugal.
Ann. Inst. Med. trop. (Lisboa) 9, 5-41,
1959
72. POSPISIL, V.F. Persistent infection of cell cultures
with Coxiella burneti.
Acta virol. 10, 542-548, 1966
73. RAMSON, S.E. Studies of the resistense of Coxiella
HUEBNER, R.J. burneti to physical and chemical agents.
Amer. J. Hyg. 53, 110-119, 1951
74. RECZKO, E. Über Ausscheidung und Verweildauer des
Q-Fiebererregers bei experimentell in-
fizierten Meerschweinchen.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 156, 81-84,
1950
75. REUSSE, U. Die Bedeutung des Q-Fiebers als Zoonose.
Z. Tropenmed. Parasit. 11, 223-262, 1960
76. RIBI, E. Purification of Q-fever rickettsiae
HOYER, B. by density gradient sedimentation.
J. Immunol. 85, 314-318, 1960

77. de RITIS, F. Ricerche sierologiche nella febbre Q.
CANALIS, A. Clin. nuova 11, 1-4, 1950
PALOMBA, R.
78. ROBBINS, F.C. Q-fever in the Mediterranean area:
GAULD, R.L. Report of its occurrence in allied
WARNER, F.B. troops. III. Epidemiology.
Amer. J. Hyg. 44, 64-71, 1946
79. ROSENBERG, M. Study of intracellular forms of Coxiel-
KORDOVA, N. la burneti in the electron microscope.
Acta virol. 4, 52-55, 1960
80. SCHAAF, J. Zur Epizootologie und Epidemiologie
des Q-Fiebers in Deutschland.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 547-551,
1962
81. SCHAAL, E. Zur Diagnose des Q-Fiebers bei Tieren.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 25-31,
1972
82. SCHAAL, E. Erfahrungen und Erfolge bei der Sanie-
SCHAAF, J. rung von Rinderbeständen mit Q-Fieber.
Zbl. Vet.-Med. B, 16, 818-831, 1969
83. SCHLIESSER, Th. Das Q-Fieber: Erfahrungen bei einer
Epidemie in München.
Der Landarzt 44, 1198-1202, 1968
84. SCHMIDT, H. Fortschritte der Serologie.
2. Aufl. Steinkopf-Verlag, Darmstadt
1955
85. SEELIGER, H.P.R. Zum Vorkommen 2-Mercaptoäthanol resi-
EMMERLING, P. stenter und empfindlicher Listeria-
Agglutinine in Human- und Tierseren.
Z. Med. Mikrobiol. u. Immunol. 155,
218-227, 1970

86. SEIGNEURIN, J.M. Essai de localisation dans les Immun-
CAPPONI, M. globulines G et M des anticorps anti
BOCK, F. Rickettsia conori et anti Rickett-
GROS, Ch. sia burneti chez le lapin.
Ann. Inst. Pasteur 123, 95-108, 1972
87. SIDWELL, R.W. Q-fever antibody response in experi-
GEBHARDT, L.P. mentally infected wild rodents and
Laboratory animals.
J. Immunol. (Baltimore) 3, 318-323,
1962
88. SIEGERT, R. Versuche zur aktiven Immunisierung ge-
und Mitarb. gen Q-Fieber.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 157, 309-325,
1952
89. SIEGERT, R. Zeitliche Entwicklung und Verweildauer
SIMROCK, W. komplementbindender und agglutinieren-
SCHWEINSBERG, H. der Antikörper bei unbehandelten und
behandelten Q-Fieber-Patienten.
Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 159, 159-169,
1953
90. SMADEL, J.E. Vaccination against Q-fever.
SNYDER, M.J. Amer. J. Hyg. 47, 71-81, 1948
ROBBINS, F.C.
91. SOTOW, A.P. Erfahrung bei der Untersuchung des Q-
Fiebers und der Tularämie Landwirt-
schaftlicher Nutztiere.
Landw. Zbl. IV, 1961, S. 670
92. STERNGOLD, E. Versuche zur Gewinnung araetogener
Vaccine gegen Q-Fieber.
Landw. Zbl. IV, 1962, S. 1866
93. STOENNER, H.G. The biologic Properties of Coxiella
LACKMAN, D.B. burneti isolates from rodents collected
in Utah.
Amer. J. Hyg. 71, 45-51, 1960

94. STOKER, M.G.P. Variation in complement-fixing activity of *Rickettsia burneti* during egg adaptation.
J. Hyg. 51, 311-321, 1949
95. STOKER, M.G.P. Phase variation of the Nine Mile and
FISSET, P. other strains of *R. burneti*.
Can. J. Microbiol. 2, 310-321, 1956
96. SVENHAG, E. The formation and properties of polio-
MANDEL, B. virus-neutralizing antibody.
II 19 S and 7 S antibody formation;
differences in antibody dose require-
ment for sustained synthesis, anamnesis,
and sensitivity to X-irradiation.
J. exp. Med. 115, 655, 1964
97. TABERT, G.G. The radioisotope precipitation test
LACKMAN, D.B. for study of Q-fever antibodies in
human and animal sera.
J. Immunol. 94, 959-965, 1965
98. TIGGERET, W.D. Studies on Q-fever in man.
BENENSON, A.S. Tr. Ass. Amer. Physicians 69, 98, 1956
99. TRUEB, C.L.P. Die Q-Fieber-Epidemie am Niederrhein,
BOESE, W. Land Nordrhein-Westfalen.
POSCH, J. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 179, 325-335,
1960
100. URAKOV, N.N. Untersuchung der aktiven und immuno-
genen Eigenschaften von löslichem *R.*
burneti Antigen, das durch Ultrabe-
schallung hergestellt wurde.
Voprosy virusologii, Moskva 7, 104-
109, 1962

101. URBACH, H. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Rickettsia burneti und ihre photographische Wiedergabe.
SPRÖSSIG, M. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 161, 39-44, 1954
102. URBACH, H. Immunelektrophoretische Untersuchungen an Rickettsia prowazekii, Coxiella burneti und Proteus X-19 Stämmen.
SCHABINSKY, G. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. 180, 433-441, 1960
103. VORONOVA, Z.A. Differentiation of 19 S and 7 S Rickettsial antibodies by passive haemagglutination reaction with Cysteine.
Acta virol. 12, 73-77, 1968
104. WAGNER, M. Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie.
Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967
105. WEISE, H.-J. Zur Epidemiologie des Q-Fiebers beim Menschen.
Ergebnisse einer Erhebung über 230 nach B.Seuch.G. gemeldeten Erkrankungsfällen (1967-69).
Bd. Ges.Bl. 14, 71-75, 1971
106. WEISS, E. Growth of Coxiella burneti in monolayer cultures of chick embryo enterodermal cells.
PIETRYK, H.C. J. Bact. 72, 235-241, 1956
107. WHO Rickettsial infections: Q-fever.
3. Bericht des FAO-WHO Sachverständigen-Ausschusses für Zoonosen Nr. 74
Gent, 1967

108. WEYER, F. Zur Übertragung des Q-Fiebers.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 154, 165-172,
1949
109. WEYER, F. Diskussionsbemerkung: Spezielle Fra-
gen zur Rickettsien-Serologie.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 157, 29-34,
1951/52

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Th. Schliesser für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung sehr herzlich danken.

Herrn Dr. W. Leyk danke ich für seine wertvollen Anregungen und seine Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Die sorgfältige Anfertigung der fotografischen Arbeiten verdanke ich Fräulein I.-M. Schultze.

Lebenslauf

Am 26. Juni 1945 wurde ich, Bernd Viehmann, als Sohn des Tierarztes Dr. Hans-Joachim Viehmann und seiner Ehefrau Edith, geb. Jordan, in Hannover geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Kassel, anschließend das Herder Gymnasium in Kassel. Dort bestand ich im Februar 1965 das Abitur.

Im Sommersemester 1965 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Am 4. August 1970 bestand ich hier die Tierärztliche Prüfung und erhielt die Bestallung als Tierarzt mit Wirkung vom 6. August 1970.

Vom 1. September 1970 bis zum 31. Januar 1971 war ich bei einem praktizierenden Tierarzt in Frankfurt tätig. Vom 1. Februar bis zum 31. Juli 1971 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen eines Forschungsauftrages am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere in Gießen. Seit 1. August 1971 arbeite ich am gleichen Institut als wissenschaftlicher Angestellter.

